

**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Eğitim Sorumlusu: Prof. Dr. Selçuk KAYA**

**SİSTEMİK OTOİMMÜN ROMATOLOJİK HASTALIĞI OLAN
BİREYLERDE VE SAĞLIKLI KONTROL GRUBUNDA ANTİ-DFS70
/LEDGF ANTİKORUNUN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BİLAL OLCAY PEKER**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ASLI GAMZE ŞENER**

**İZMİR
ARALIK-2014**

**İZMİR ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

**SİSTEMİK OTOİMMÜN ROMATOLOJİK HASTALIĞI OLAN
BİREYLERDE VE SAĞLIKLI KONTROL GRUBUNDA ANTİ-DFS70
/LEDGF ANTİKORUNUN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BİLAL OLCAY PEKER

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ASLI GAMZE ŞENER

Bu tez İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014-17797 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

ARALIK-2014

I.ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışma, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Başasistanı Doç.Dr.Aslı Gamze ŞENER danışmanlığında yürütülmüş ve sonuçlanmıştır.

Araştırmamızda, sistemik otoimmün romatolojik hastalığı olan hastalarda ve sağlıklı bireylerde anti nükleer antikor tarama testinde sıklıkla rastlanan Anti-DFS70 otoantikorunun görülme sıklığı amaçlanmıştır. Romatoloji polikliniğine başvuran sistemik otoimmün romatolojik hastalığı olan bireyler ve kan bankası sağlıklı kan donörleri araştırmamızda çalışma grubu olarak yer almıştır. İndirekt immünfloresan ve sandwich elisa yöntemi ile anti-DFS70 otoantikorunun bu gruplar arasındaki yüzdesi saptanmış ve daha önceki çalışmalarla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim sorumlusu Prof. Dr. Selçuk KAYA ve hocalarım. Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER ve Doç. Dr. Emine Figen TARHAN 'a teşekkürlerimi ve saygılarımı arz ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen sevdiklerime, sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Bilal Olcay PEKER

Aralık 2014

II.İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER ve KISALTMALAR	III
ŞEKİLLER	IV
TABLolar	V
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 İmmün Sistem	3
2.1.1 İmmün Sistem Yanıtları	3
2.1.2 Doğal İmmün Yanıt	3
2.1.3 Edinsel İmmün Yanıt	5
2.2 İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite	5
2.2.1 Santral Tolerans	7
2.2.2 Periferik Tolerans	7
2.2.3 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler	9
2.2.3.1 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Diğer Faktörler	10
2.3 Otoantikorlar ve Otoimmün Hastalıklar	12
2.3.1 Romatoid Artrit	12
2.3.1.1 Romatoid Artrit İle İlişkili Otoantikorlar	13
2.3.2 Sistemik Lupus Eritamatozus	14
2.3.3 Ankilozan Spondilit	15
2.3.4 Skleroderma (Sistemik Skleroz)	15
2.3.5 Sjögren Sendromu	16
2.3.6 Polimiyositis/Dermatomyositis	16
2.4 Anti nükleer antikorlar (ANA) ve Klinik Önemi	17
2.4.1 ANA Subtipleri	18
2.4.2 Anti Nükleer Antikorların Laboratuvar Tanı Yöntemleri	22
2.4.3 Ekstrakte Edilebilen Nükleer Antijenler (ENA)	25
2.4.4 ANA IIF Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri	26

2.4.5 ANA IIF Testinde Hücre Sitoplazmasında Gözlenen Boyanma Şekilleri	30
2.5 Anti-DFS70 Otoantikoları	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1 Gereç	36
3.1.1 Kontrol Grubu Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	36
3.1.2 Romatoloji Polikliniğine Başvuran SARD Bulunan Grup	36
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	36
3.2 Yöntem	37
3.2.1 İndirekt İmmün Floresan (IIF) Yönteminin Uygulanması ve Prensibi	37
3.2.1.1 Floresan ANA IIF Testinin Çalışılması	38
3.2.1.2 Floresan Mikroskop Değerlendirmesi	39
3.2.2 Ektrakte Edilebilen Nükleer Antijen Yöntemi Uygulanması ve Prensibi	40
3.2.3 Anti-DFS70 Sandwich ELISA Yönteminin Uygulanması ve Prensibi	41
3.2.4 İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1 Gruplar Arası Yaş ve Cinsiyet Verileri	45
4.2 Gruplar Arası IIF ANA Testi Verileri	46
4.3 Gruplar Arası IIF ANA Testi Anti-DFS70 Patern Verileri	48
4.4 Gruplar Arası Anti-DFS70 Patern Örneklerinin ELISA Testinde Doğrulanması	48
5. TARTIŞMA	53
SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	70

III.SİMGELER VE KISALTMALAR

ACA	:Anti-sentromer Antikorları
ANA	:Anti Nükleer Antikor
Anti DFS-70	:Anti Dense Fine Speckled 70 (Anti - Yoğun İnce Benek)
Anti-dsDNA	:Anti-double-strandedDNA
Anti- ssDNA	:Anti-single strandedDNA
Anti-Sm	:Anti-Smith
APC	:Antigen Presenting Cell (Antijen Sunucu Hücre)
AS	:Ankilozan Spondilit
BDH	:Bağ dokusu hastalığı
CENP	:Centromer Protein (Sentromer Protein)
CCP	:Cyclic Citrullinated Peptid
dcSSc	:Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis
DFS	:Dense Fine Speckled
DM	:Dermatomyositis
EBV	:Epstein Barr Virus
ELISA	:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENA	:Extractable Nuclear Antigen (Ekstrakte Edilebilen Nükleer Antijen)
FITC	:Fluorescein IsoThioCyanate
HEp-2	:Human Epithelial Cell Line 2000
HLA	:Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
IB	:İmmunoblot
Ig	:İmmünglobulin
IFN-α	:İnterferon alfa
IFN-β	:İnterferon beta
IIF	:İndirekt İmmün Floresan

IL	:İnterlökin
kDa	:kiloDalton
LEDGF	:Lens Epitel Derivated Factor (Lens Epitelinde Türevli Büyüme Faktörü)
MCTD	:Mix Connective Tissue Disease
MHC	:Major Histocompatibility Complex (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi)
NK	:Natural Killer (Doğal Öldürücü Hücreler)
µL	:Mikrolitre
mL	:Mililitre
L	:Litre
PBS	:Phosphate Buffer Saline
PCNA	:Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pg	: Pikogram
PM	:Polimyozitis
RA	:Romatoid Artrit
RF	:Romatoid Faktör
RIA	:Radioimmünassay
RNP	:Ribonucleic Particle
SARD	:Systemic Autoimmun Rhomatological Disease (Sistemik Otoimmün Romatolojik Hastalık)
SLE	:Sistemik Lupus Eritematozus
SRP	:Signal Recognition Receptor
SSc	:Sistemik Skleroz
Scl-70	:Topoizomeraz I
Th	:helper T cell (Yardımcı T Hücresi)
TNF-α	:Tümör Nekroz Faktör alfa
Ts	:supresör T cell (Baskılayıcı T Hücresi)

IV.ŞEKİLLER

Şekil 1. Öz Antijenlere Merkezi ve Periferik Tolerans	9
Şekil 2. Mikroorganizmaların Otoimmüniteye Yol Açma Mekanizmaları	11
Şekil 3. İndirekt İmmün Floresan Test: <i>Crithidia luciliae</i>	27
Şekil 4. Nükleer Membran ve Homojen Patern	28
Şekil 5. Nükleer Matriks, Kaba Benekli ve İnce Benekli Patern	28
Şekil 6. Anti-DFS70 Patern	29
Şekil 7. Sentromer Patern	29
Şekil 8. Nükleolar Küme ,Nükleolar Homojen ve Nükleolar Benekli Paternleri	30
Şekil 9. Anti-DFS70/LEDGF otoantikorunun otoimmün inflamatuvar hastalıkların patogenezinde olası katkısını gösteren model.	33
Şekil 10. Karakteristik Boyanma Paternleri ve Anti-DFS70 Antikorları İçin Önerilen TestAlgoritması.	35
Şekil 11. ANA IIF Anti-DFS70 Pozitif Patern Görüntüleri	48

V.TABLolar

Tablo1. BDH Dışında ANA'nın Pozitif Olabileceği Durumlar	18
Tablo 2. Kit İçeriği	42
Tablo 3. Gruplar Arası Yaş Dağılım Grafiği	45
Tablo 4. Gruplar Arası Cinsiyet Dağılım Oranları ve Sayısı	46
Tablo 5. Gruplar Arası IIF İncelemesinde ANA Pozitiflik Oranları	47
Tablo 6. Konsantrasyon ve Absorbans Standart Eğrisi	49
Tablo 7. Anti-DFS70 Cut-off Konsantrasyon Grafiği	50
Tablo 8. IIF ANA ve ELISA testi Anti-DFS70 Antikor Sayıları	50
Tablo 9. Gruplar Arası Anti-DFS70 Antikor Oranı	51

1.GİRİŞ

Sistemik otoimmün romatolojik hastalıklar (SARD: Systemic Autoimmun Rheumatological Disases) önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Otoimmün romatizmal hastalıklar birçok ortak özellik ve klinik belirtiyeye sahip olmalarına rağmen, klinik seyirlerinde önemli ayrımlar bulunmaktadır (1). Hücre içi antijenlere karşı üretilmiş olan antinükleer antikorlar (ANA) gibi çeşitli otoantikörlerin varlığı SARD'ın özellikleridir (2).

İndirekt immünfloresan (IIF) yöntemi rutinde ANA tespitinde en sık kullanılan ve altın standart olan testtir (3). Anti-yoğun ince benekli 70 (anti-DFS70: Anti dense fine speckled 70) antikörler, ilk olarak, interstisyel sistitli, bir hastanın ANA IIF test paterninde tanımlanmıştır (4). Tipik DFS IIF boyama modeli çekirdeğin interfaz evresi boyunca ve metafaz kromatinlerinde eşit olarak dağılmış ince benek paterni olarak kabul edilmektedir. İmmunoblot (IB) testinde 70kDa proteinin tespitinden sonra DFS70 olarak adlandırılmıştır. Fakat birincil hedef otoantijen ilk olarak lens epitelinde türevli büyüme faktörü (LEDGF: Lens Epithel Derivated Factor) veya DNA bağlayan transkripsiyon koaktivatör p75 olarak tanımlanmıştır. Bu protein, yüksek oranda prostat tümör dokularında bulunur ve viral integras ile etkileşim yoluyla insan bağışıklık yetmezlik virüsü replikasyonu için kofaktör olmak gibi bazı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (5).

Dellavance ve ark. (6) IIF ve IB ile incelenen 10.000 ANA pozitif serum örneği üzerinden yaptıkları değerlendirmede anti-DFS70 antikörlerinin ANA pozitif ve herhangi bir SARD kanıtı içermeyen bireyler arasında yaygın olduğunu bildirmiştir. Anti-DFS70 antikörleri Vogt-Harada sendromunda % 66.7 , Atopik dermatit (AD) de %30 ve sağlıklı bireylerde ~% 10 oranında bildirilmiştir. Bunu takiben SARD tanısı almış hastalarda sıklığı anlamlı olarak daha düşük (~ % 2-3) olarak bildirilmiştir(1). SARD olan hastalarda anti-DFS70 antikörlerinin yaygınlığının düşük olması bize klinikte ANA pozitif sağlıklı bireyler ve / veya AD gibi diğer inflamatuvar durumları SARD lı hastalardan ayırmak için kullanılabilir, potansiyel öneme sahip bir biyomarker olarak görmemizi sağlamıştır. Göreceli olarak SARD da gözlenen düşük oranın altında yatan nedenler belirsizdir ama bu demografik , genetik veya etkin tedavi müdahalelerinden kaynaklanabilir (7).

Anti-DFS70 otoantikolarının sistemik otoimmün romatolojik hastalıklar için bir tanı kriteri olabileceğini savunan araştırmacıların yanı sıra bir dışlama belirteci olabileceği de dūřünölmektedir (8). Bu çalışmada rutin ANA IIF testinde sıklıkla saptanabilen ama hakkında çok fazla araştırma yapılmamış olan anti-DFS70 (anti-LEDGF) otoantikorumun, sistemik otoimmün romatolojik hastalığın tanısına katkısının araştırılması ve elde edilen sonuçlar ışığında bu otoantikorum olası öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca anti-DFS70 paterninin tanısında enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testinin etkinliğinin araştırılması planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İmmün Sistem

“İmmün” Latince kökenli bir deyim olup, eski Roma’da vergiden ve askerlikten muaf (bağışlanmış) olanlar için kullanılan “immunis” kelimesinden türemiştir. Kişilerin bazı hastalıklara karşı bağışıklık kazanabileceği ve hasta olmaksızın hastalıklardan yaşam boyu bağışlanmış kalınabileceği düşünülerek bu bağışıklık (muafiyet) hali immünite olarak adlandırılmıştır. İmmünoloji, bu bağışıklığın nasıl oluştuğunu biyolojik ve klinik sonuçları ile birlikte inceleyen bilim dalıdır (9).

Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem denir. İmmün sistemin fizyolojik işlevi enfeksiyonları engellemek ve yerleşmiş enfeksiyonları yok etmektir. Bağışık yanıt özünde hücresel bir olaydır. İmmün hücreler kemik iliğindeki kök hücreden farklılaşarak gelişirler. Kemik iliği kök hücrelerinin immünolojik olarak etkin hücre haline gelebilmesi için önce santral lenfoid organlarda olgunlaşmaları gerekir. Gelişimini tamamlayan, olgun T ve B lenfositler daha sonra periferik lenfoid organlara yerleşerek antijenle karşılaşmayı bekler ve gerektiği zaman (antijenle karşılaşınca) bağışık yanıt oluştururlar (10).

2.1.1 İmmün Sistem Yanıtları

Organizma yabancı bir madde (mikroorganizmalar, protein ve polisakkarit gibi makro moleküller vs.) ile karşılaştığında immün sistemin değişik kompartmanlarının karşılıklı ve düzenli etkileşimleriyle ortaya çıkacak cevaba “ immün yanıt” denir. Deri ve muköz membranların fiziki bariyerleri, kan ve dokulardaki fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller), doğal öldürücü hücreler (NK), akut faz proteinleri ve kompleman sistemi doğal immünitenin başlıca elemanlarıdır. Aktive makrofajlardan salgılanan interferon alfa (IFN- α) , interferon beta (IFN- β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi sitokinler de doğal immünitenin birer elemanı olarak işlev görmektedir (11-14).

Spesifik immünite, bir yabancı ajan ile karşılaşıldığında uyarılan, sadece ona

özgü olarak gelişen ve o ajanla tekrar karşılaşıldığında daha güçlü yanıt verilmesini sağlayan sistemdir. Lenfositler, antikorlar ve lenfokinler spesifik immünitenin başlıca elemanlarıdır. Spesifik immünite, doğal immünitenin koruyucu mekanizmalarını güçlendirir, bu mekanizmaları antijenin giriş yerine yönlendirerek yabancı antijenin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır. Spesifik immünite, aktif veya pasif olarak oluşturulabilir. Organizmanın yabancı antijene karşı aktif immün yanıt vererek geliştirdiği immüniteye “aktif immünite”, spesifik olarak immünize olmuş bir bireyden serum veya hücrelerin immün olmayan bireye nakil edilmesiyle geliştirilen immüniteye ise “pasif immünite” denir. Spesifik immün yanıtlar, cevabı oluşturan immün sistem elemanlarına göre iki gruba ayrılır:

1.Humoral immünite: Antijeni spesifik olarak tanıyan ve ortadan kaldırılmasını sağlayan antikorlar başlıca rol oynar.

2.Hücrel immünite: Antijeni spesifik olarak tanıyan T lenfositler başlıca rol oynarlar.

İmmün Tanıma: Lenfositlerin üzerindeki reseptörler tarafından tanınabilen moleküller “antijen” olarak isimlendirilir ve küçük kimyasal moleküllerden yüksek kompleks moleküllere kadar değişik çeşitlerde olabilirler. T hücre ve B hücre yüzeyinde bulunan reseptörler, kompleks bir antijenin sadece antijenik epitop denilen küçük bir parçasını tanıyabilirler.

İmmün cevabı uyaran antijenlere “immünojenler” adı verilir. Bütün antijenler immünojenik değildir. Küçük, nonimmünojenik antijenlere “hapten” adı verilir ve immün yanıtı uyarabilmeleri için ”taşıyıcı” adı verilen büyük immünojenik moleküllere bağlanmaları gerekir. Büyük protein antijenler genellikle taşıyıcı ve haptene eşdeğer epitoplara içerirler ve bu nedenle immünojeniktirler. Antijen spesifik immüniteyi nonspesifik olarak artıran substanslara “adjuvan” denir ve büyük protein antijenlerini bile daha immünojenik yapabilirler (11-14).

2.1.2 Doğal İmmün Yanıt

Doğal immün sistem immünolojik hafızaya sahip olmayan tüm immün defans mekanizmalarını içerir. Bu nedenle, doğal immünitenin bir özelliği antijenle ne

sıklıkla karşılaşırsa karşılaşın immün yanıtın değişmemesidir. İmmün yanıtın bu tipi gelişim esnasında spesifik yanıtlardan daha önce gelişir. Doğal immün yanıtlar antijenle karşılaşılmadığı durumlarda da vardır ve bunların koruyucu etkisi yabancı ajan için spesifik değildir. Bu defans mekanizmaları özellikle mikrobiyal patojenle ilk temas sırasında önemlidir. Doğal immün defans mekanizmaları; yapısal bariyerleri (deri ve onun sekresyonları, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi epiteli), myeloid hücreleri, solubl ajanları (eksternal sekresyonlardaki gastrik asit, müsin, laktoferrin ve lizozim gibi), fagositleri, NK hücrelerini ve sistemik dolaşımdaki kompleman komponentlerini içerir (11-14).

2.1.3 Edinsel İmmün Yanıt

Edinsel immünite adaptif, özgül veya kazanılmış immünite olarak anılır, mikroorganizmalara karşı etkin savunmayı sağlamadan önce lenfositlerin çoğalması ve farklılaşması gerekir, böylece lenfositler mikroorganizmalara göre uyarlanmaktadır. Edinsel immün yanıtın elemanları antijen ile spesifik olarak reaksiyona girerler ve bu antijenlere sonraki karşılaşmalarında daha güçlü bir cevap oluştururlar (spesifite ve hafıza özelliği). Mikroorganizmalara karşı konağın spesifik immün yanıtı, antikor olarak da tanımlanan immünglobulinler (İg) ve T lenfositler aracılığı ile olur. Lenfosit gelişiminin erken evresinde bir antijenin varlığına gerek yoktur, fakat bu hücreler olgun bir antijen reseptörü eksprese ettikten sonra yaşamaları ve daha ileri değişimleri antijene bağımlıdır (11-14).

2.2 İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite

Organizmaya yabancı olan mikroorganizmaları, allerjenleri ve diğer molekülleri tanıyıp bir seri savunma mekanizması geliştirerek onları elimine etmek immün sistemin temel görevidir. Bu süreç makrofajlar, T ve B lenfositleri ile çeşitli biyolojik mediatörler arasındaki karmaşık ilişkilerle sağlanmaktadır. İmmün sistem bir taraftan yabancı determinantlara karşı cevap geliştirerek onları ortadan kaldırmakla görevlidir, diğer taraftan immün homeostazı korumak için çalışmaktadır (15).

İmmün sistemin belirli bir antijene karşı yanıtızsız kalması durumuna

immünolojik tolerans adı verilmektedir. Bu yanıtızsızlığın organizmanın kendisine ait olup immünojenik özellik gösteren determinantlara karşı gelişmesi durumuna doğal immünolojik tolerans (self tolerans), yabancı antijenlere karşı gelişmesine ise kazanılmış immünolojik tolerans adı verilmektedir (16).

Normal koşullarda immün sistemin kendi antijenik yapılarına karşı bir immün yanıt oluşturmadığı bilinmektedir. Oysa her bireyin kanında, hücrelerinde ve konnektif dokularında immün yanıt oluşturabilecek potansiyele sahip yapılar bulunmaktadır. Bu antijenlere self-antijen veya öz antijen adı verilmektedir. Öz antijenler lenfositlerle sıklıkla karşılaşmalarına rağmen immün yanıt oluşturmamaktadırlar. Bu spesifik cevapsızlık durumundan çeşitli mekanizmaların sorumlu olduğu bilinmektedir. Bunlar:

a) Klonal delesyon: Bu mekanizma ile self antijenlerle reaksiyon veren T lenfositleri timustaki eğitime süreci içinde olgunlaşmadan apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmaktadır. Timustan kaçarak perifere geçmeyi başaran az sayıda T lenfositisi ise yine apoptoz ile elimine edilmektedir.

b) Saklı antijenler: Beyin, testis ve göz gibi organlarda bulunan antijenler immün sistemle karşılaşmadıkları için bunlara karşı bir immün yanıt gelişmemektedir.

c) Antijeni görmezden gelme: Bazı self antijenler antijen sunucu hücrelerin (APC) yüzeyinde yoğun bir biçimde sergilendikleri için bunlara karşı ne tolerans, ne de immün yanıt gelişmektedir.

d) Anerji: T lenfositlerine karşı APC tarafından gönderilen tanıma sinyali bu hücrelerin aktive olması için yeterli olmamaktadır. Ayrıca yine APC tarafından kostimülatör sinyal veya sekonder sinyal adı verilen ikinci bir sinyal molekülünün sergilenmesi gerekmektedir. Aksi takdirde T hücreleri anerjik fazda kalacaklardır.

e) Supresyon: Self antijenlerle güçlü reaksiyon veren B hücreleri birçok bireyde bulunmaktadır. Bu self reaktif B lenfositleri, uygun CD4 (+) T helper (Th) hücrelerinin supresör T (Ts) hücreleri ile baskılanması sonucu ortadan kalkmakta veya anerjik fazda kalarak aktive olamamaktadır. Kısacası self-reaktif B lenfositleri

Ts hücreleri ile dolaylı olarak baskılanmaktadır.

Self yapılara karşı oluşan toleransın çeşitli sebeplerden dolayı kaybolması sonucunda immun sistem kendi öz antijenlerine karşı da immun reaksiyonlar gösterebilmektedir. İmmun sistemin kendi öz antijenlerine karşı immun reaksiyon göstermesi olayı otoimmünite olarak adlandırılmaktadır (16-19).

2.2.1 Santral Tolerans

Kemik iliğinde T hücre grubuna farklılaşan lenfositler timusa gelerek olgunlaşmalarını tamamlar. Bu dönem içinde T lenfositlerinde T hücre yüzey reseptörleri, CD4(+) ve CD8(+) yardımcı molekülleri oluşmaktadır. Farklı APC hücreleri tarafından bu olgunlaşma döneminde T lenfositlerine büyük doku uygunluk kompleksine (MHC) bağlı self antijenler sunulmaktadır. MHC-self antijen kompleksine düşük afiniteyle bağlanan T lenfositleri sinyal alamadıkları için spontan bir şekilde apoptozdan korunmakta ve timusta ölmektedirler. Bu komplekse yüksek afiniteyle bağlanan T lenfositleri ise apoptoz ile ortadan kaldırılmakta ve bu olay negatif seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. MHC molekülüne bağlı self yapılara orta düzeyde afinite gösteren diğer T lenfositleri ise timusta olgunlaşmasını tamamladıktan sonra perifere ulaşmayı başarmaktadır. Bu olay ise pozitif seleksiyon olarak adlandırılır. Santral toleransın oluşabilmesi için otoantijenlerin timusta T hücrelerine tanıtılması gerekmekte ve timusta bulunmayan self yapılara karşı tolerans oluşumu için periferik toleransa ihtiyaç duyulmaktadır (12,20,21).

T lenfositlerinin aksine B lenfositleri antijen üzerindeki uygun epitoplara B hücre yüzey reseptörleriyle antijen sunumu olmadan veya MHC molekülüyle ilişki kurmadan bağlanmaktadır. Bu nedenle pozitif seleksiyon oluşmamakta ancak kemik iliğinde negatif seleksiyonla self reaktif, olgunlaşmamış B lenfositleri elimine edilmektedir (22).

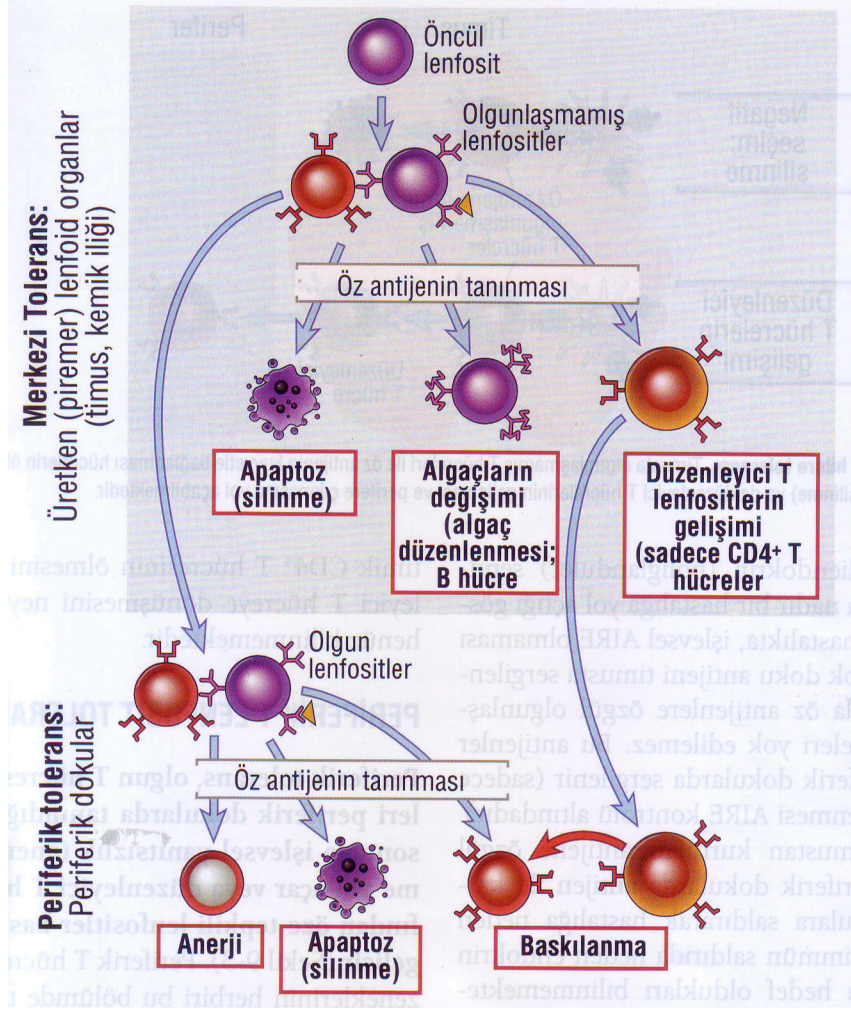
2.2.2 Periferik Tolerans

T hücrelerinin aktive olabilmesi için APC tarafından verilen tanıma sinyali tek başına yeterli olmamakta, aynı zamanda yine APC tarafından alınacak kostimülör sinyale de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum interlökin 2 (IL-2) gibi T

hücre büyüme faktörünün salgılanmasına yol açacaktır. Kostimülatör sinyali alamayan T hücreleri ise uzun süren bir cevapsızlık dönemine, yani anerjik faza geçmektedirler. APC yüzeyinde kostimülatör moleküllerin sergilenmemesi durumunda bu hücrelerin aktive edeceği self reaktif T lenfositleri anerjik hale geçmekte ve IL-2 sentezleyemeyip kısa süre içinde ölmektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyondaki antijenler, spesifik T hücrelerini sürekli olarak uyarmakta ve onların Fas ligand aracılığıyla, apoptozis sonucu ölümüne yol açmaktadır. Bazı lenfositler ise anerjik olmadıkları halde Ts hücreleri tarafından inhibe edilmektedirler. Bu mekanizmaların yanında T lenfositlerinin bazı antijenlere karşı duyarsız kaldığı bilinmektedir (23-25).

B hücrelerinin periferde aktive olabilmeleri için Th hücrelerinin yardımı gerekmektedir. B hücre yüzeyindeki CD40 ligandı ile aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyindeki CD40 ligandı etkileşmekte ve Th2 hücreleri IL-4 ve IL-5 gibi sitokinler salgılamaktadır. Bu yolla, immatur B hücreleri aktive olabilmektedir. B lenfositlerinde tolerans oluşumu için gerekli antijen miktarı T hücrelerine oranla daha fazladır. Böylece daha kolay oluşan bir T hücre toleransı, B hücrelerinin de tolerize edilmesini sağlamaktadır (25-27).

Özetleyecek olursak primer lenfoid organlarda gerçekleşen santral toleransın başlıca düzenegini oluşturan T hücreleri öz antijenlerle karşılaşp kuvvetli etkileşim sonucu apoptoza uğrayarak negatif seçim gerçekleşmektedir. Timusta öz antijenleri yüksek affinite ile tanıyan bazı olgunlaşmamış CD4 (+) T hücreler düzenleyici T hücrelerine dönüşerek periferik dokulara yerleşirler. B lenfositlerde ise gerçekleşen negatif seçimin yanında öz antijenlere özgül olmayan yeni reseptör algacı oluşturulmaktadır. Periferik dokulara geçen olgunlaşmış lenfositler öz antijenlerle karşılaştıklarında etkin duruma geçemezler veya silinirler ya da düzenleyici T hücreleri tarafından baskılanırlar (Bkz. Şekil 1) (19).



Şekil 1. Öz Antijenlere Merkezi ve Periferik Tolerans (19)

2.2.3 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Hem hüresel, hem de humoral immün yanıtta kontrol görevi gören Th hücreleri ile ilişkili tolerans bozukluklarının otoimmünite ile sonuçlanma ihtimali yüksektir. Ancak otoimmün hastalıkların oluşumunu tek bir mekanizma ile açıklamanın mümkün olmayacağı önemle vurgulanmaktadır. Bu süreçten sorumlu olduğu düşünülen birkaç farklı mekanizma tanımlanmıştır (17,18).

a) Daha önce immün sistemle karşılaşmamış sekestre (saklı) antijenler travma gibi herhangi bir etken sonucu dolaşıma karıştıklarında immün yanıtı yol açabilmektedirler. Örnek olarak gözün içinde bulunan uvea antijenlerinin gözün zedelenmesi sonucu dolaşıma karışması, sempatik oftalmi hastalığına yol açmaktadır.

b) Organizmanın kendisine ait olarak tanıdığı ve normalde immün yanıt geliştirmedeği yapılar fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliğe uğradıkları zaman immün sisteme yabancı hale gelmekte ve sonuçta immün cevaba yol açmaktadırlar.

c) Yabancı bir antijenle vücudun kendisine ait olan bir yapı çapraz reaksiyon gösterebilmektedir. Örneğın streptokoklardaki M proteiniyle kalp kası arasındaki çapraz reaksiyon sonucu miyokardit oluşabilmektedir.

d) Th hücrelerinin Ts hücreleriyle baskılanması B lenfositlerinin aktive olmasını önler. Ts hücrelerindeki yapısal bir bozukluk Th hücrelerinin sürekli olarak otoreaktif B lenfositlerini aktive etmesine neden olmakta ve bu durum otoantikor senteziyle sonuçlanmaktadır (26,27).

2.2.3.1 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Diğer Faktörler

a) Genetik Faktörler

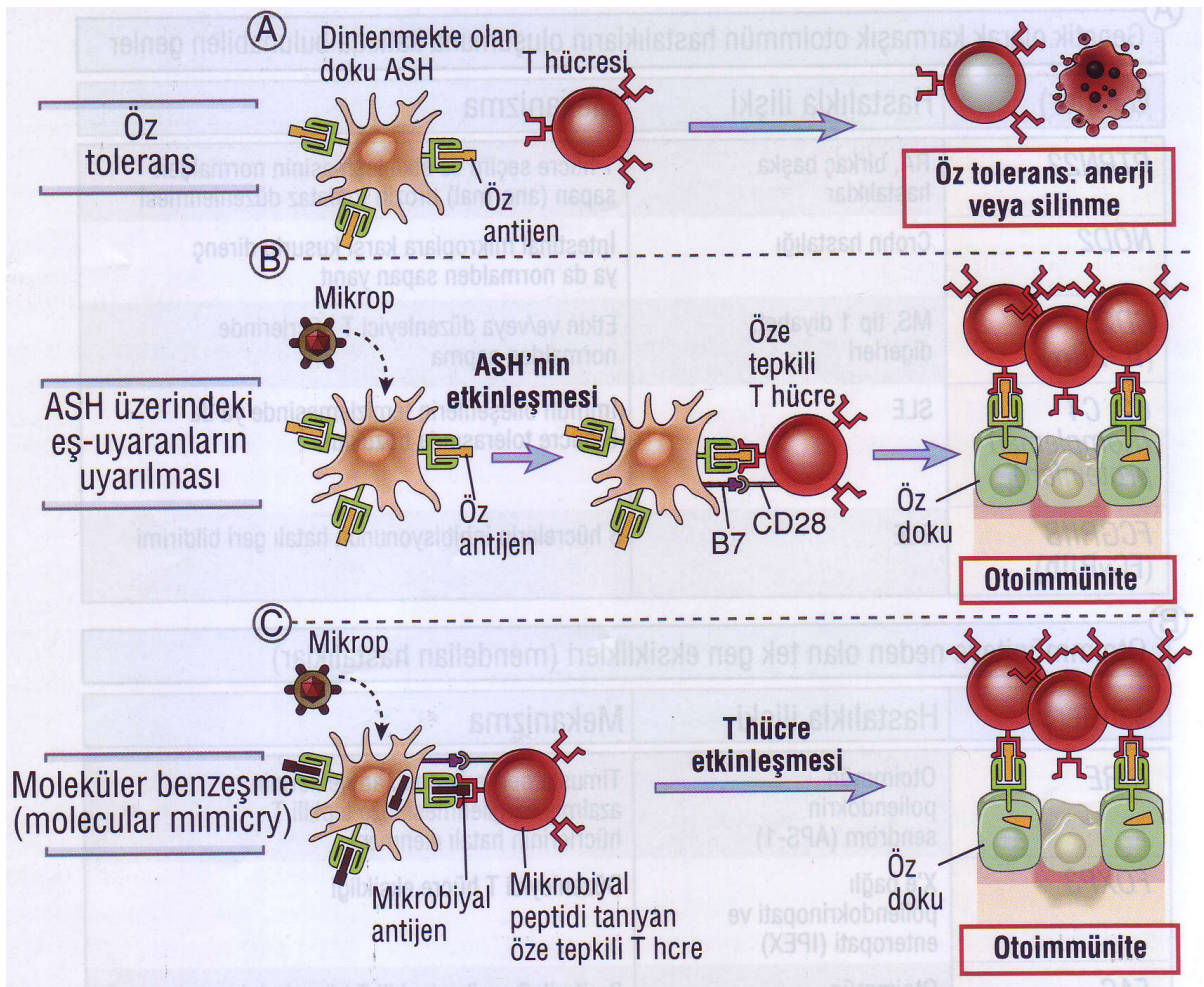
Birçok gen otoimmün hastalığa yatkınlığa neden olur, ama bunlardan en önemlileri insan lökosit antijen (HLA) allelleridir. Bazı HLA'ları yöneten gen lokusları, bazı otoimmün hastalıklarla ilişkili bulunmaktadır. Örneğın Romatoid artrit (RA) HLA-DR4 ile, Ankilozan Spondilit (AS) HLA-B27 ile ilişkili bulunurken Addison hastalığı ise HLA-B8 ile ilişkilendirilmektedir. Burada belirli bir HLA allelini taşımanın otoimmün hastalığın gelişme riskini arttırdığını, ancak allelin kendisinin hastalık nedeni olmadığını unutmamak gerekir. Otoimmün hastalıkla ilişkili HLA allelini taşıyan bireylerin büyük çoğunluğu o hastalığa yakalanmamaktadır.

HLA ile ilişkili olmayan genlerin polimorfizmleri çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkilidir ve self toleransın bozulmasına katkı sağlarlar ancak tek tek az miktarda etki gösterirler ya da hiç etki göstermezler. Örneğın PTPN22 (protein tirozin fosfataz N22) RA ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi romatizmal hastalıklarla ilişkili bulunmuştur.

b) İnfeksiyon Etmenlerinin Rolü

Enfeksiyonlar birçok yolla otoimmünitenin gelişimine katkıda bulunabilirler.

Bir dokunun enfeksiyonu o bölgede doğal immüntenin etkin hale geçmesine böylece APC tarafından eş-uyaran iletilerinin ve sitokinlerin üretimini artırmasına neden olabilir. Bunun yanında bazı mikroorganizmalara ait antijenler bazı HLA antijenleriyle moleküler açıdan benzerlik gösterebilmektedir. Bu durumda öz antijenlerimize çok benzeyen veya çapraz reaksiyon veren antijenler üretilir. Bu çapraz reaksiyon moleküler benzeşme (mimicry) olarak tanımlanır. Bazen de T hücreleriyle enfeksiyon etkeninin ortak antijen taşıması, bu hücrelerin anerjik hale geçmelerine yol açarak otoimmün olayları başlatabilmektedir (Bkz. Şekil 2) (19).



Şekil 2. Mikroorganizmaların Otoimmüniteye Yol Açma Mekanizmaları (19)

c) Hormonal Faktörler

Bazı durumlarda bir hormon veya biyolojik mediatöre karşı spesifik idyotip

antikorlar oluşmakta ve bu antikorlara karşı da antiidiyotip antikorlar sentezlenmektedir. Bunlar hormon veya mediatöre bağlanan antijene benzerlik gösterdikleri için, antikorların antijenle ilişki kurdukları hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır. Bunlara anti reseptör antikorlar adı verilmektedir. Bu durumda reseptör hasar görmekte ve fonksiyon bozukluğu oluşabilmekte ya da hormonun bağlanması engellenerek hormona karşı direnç artmaktadır. Son olarak reseptör aktive olabilmektedir (19,27,28).

2.3 Otoantikorlar ve Otoimmün Hastalıklar

Otoantikorlar, vücudun kendi öz antijenlerine karşı oluşur, oysa ki immün sistemde görevli hücrelerin tolerans mekanizması ile çalışması beklenir. Bu mekanizma düzgün çalışmaz ise otoimmün hastalıklar görülebilmektedir. Otoantikorlar, bireylerde SARD (veya organ spesifik otoimmün hastalıkların) belirteci olabilecekleri gibi, sağlıklı bireylerde de bulunabilirler. Bu antikorlar bir organ veya dokuya özgül olabilmekte veya vücudun birçok farklı dokusunda bulunan hücre nükleusu, mitokondri, DNA ve IgG gibi yapılara da bağlanabilmektedirler (28,29).

Otoimmün yanıtın tipine göre bazı otoimmün hastalıklarda immün yanıt tek bir organ veya dokuyla sınırlı kalabilmektedir. Bunlara organ spesifik otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. Örneğin Hashimoto tiroiditinde özgül bir biçimde tiroid bezi elemanlarına karşı immün yanıt gelişmektedir. Diğer taraftan bazı otoimmün hastalıklarda ise birçok farklı organ tutulumu söz konusudur. Bu hastalıklara ise organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. Örnek olarak RA ve SLE gibi hastalıklarda deri, böbrekler, akciğer, sinir sistemi ve eklemlerde otoimmün reaksiyonlar gelişebilmektedir (28,30,31).

2.3.1 Romatoid Artrit

RA erişkinde en sık görülen, etyolojisi henüz net olarak bilinmeyen primer olarak sinovyal dokuları hedef alan, sistemik otoimmün bir hastalıktır. Sinovyumun aşırı proliferasyonu, etrafındaki dokuların erozyonuna yol açar. Simetrik poliartiküler tutulum karakteristik olmasına rağmen oligoartiküler ve monoartiküler tutulum ile de

kendini gösterebilir. Sistemik bir hastalık olma özelliği ile birçok doku ve sistemi etkileyebilir. RA herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve hastaların %80'i 35-50 yaşları arasındadır. Kadın cinsiyette 2-3 kat daha fazla görülür. Dünyada görülme sıklığı %0.5-1 arasında değişmekle birlikte coğrafi dağılım, ırk ve etnisiteye göre farklılıklar gösterebilir (32-40).

Ülkemizde Akar ve ark.(41)'nın İzmir bölgesinde yaptıkları bir çalışmada RA prevalansı % 0.5 bulunmuştur.

Primer olarak sinovyal dokuları etkileyen bu hastalığın patogenezinde CD4(+) T lenfositler rol almaktadır. APC (makrofaj, dendritik hücre, tip A sinoviyosit, B lenfositler) tarafından T hücrelerine antijen sunulur. Makrofajlar, plazma hücreleri, B hücreleri ve lökositler aktive olur ve bunların sentezledikleri sitokinler, büyüme faktörleri, PGE₂, elastaz, kollajenazlar, sitromelisin gibi proteazlar ve diğer enzimler eklem hasarına neden olurken fibroblastlar, kondrositler ve sinovyal hücreler proliferer olur. Bu kemik-kıkırdak destrüksiyonu, fibrozis ve ankiloza neden olur (33,38-40).

2.3.1.1 Romatoid Artrit İle İlişkili Otoantikolar

a) Romatoid Faktör

Romatoid faktör (RF), IgG'nin Fc parçasının C γ 2 ve C γ 3 zincirlerine karşı üretilmiş bir antikordur. RA'lı hastaların %70-80'inde pozitif sonuç verir ve RF varlığının RA tanısını belirlemedeki prediktif değeri düşük olduğu için RF pozitifliği RA tanısını koydurmaz. Bu nedenle tarama testi olarak kullanılmamaktadır. Ancak, klinik olarak şüphelenilen bireylerde tanıyı doğrulamak için RF bakılabilir. RF varlığı prognostik açıdan önemli olabilir, çünkü yüksek titreleri olan kişilerde, eklem dışı bulgular daha sık görülmektedir (38-40,42,42).

b) Anti-cyclic citrullinated peptide (Anti- CCP)

RA ya spesifik epitoplara benzeri yapay peptit olan flagrin ve onun sirküler formu gibi sitrulinize proteinlere karşı oluşmuş antikora "cyclic citrullinated peptide" (CCP) antikoru denir. Anti-CCP, antikeratin antikoru ve antiperinükleer

faktörün de bulunduğu antifilagrin antikorları ailesinin bir üyesidir. Anti-CCP antikorları RA' da çok erken evrede saptanabilir. Anti-CCP antikorları erozif ve erozif olmayan RA ayırıcı tanısında çok güçlü bir parametredir. RA'da anti-CCP, RF ile birlikte bakıldığında prognoz takibi açısından çok daha etkili olabilir. Anti-CCP pozitif olan RA'lı olgularda radyolojik olarak eklem hasarı, negatif olanlara göre daha belirgindir (44-46).

2.3.2 Sistemik Lupus Eritamatozus

SLE etyolojisi tam olarak bilinmeyen, başvuru şekli, seyri ve prognozu bireysel farklılıklar gösteren sistemik otoimmün bir hastalıktır. Etiyolojide genetik, hormonal, çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hastalık 20-40 yaş arasındaki kadınlarda; yüzde kelebek şeklinde döküntü ve artralji karakteristiktir. Akciğer, böbrek, kalp, sinir sistemi ve diğer organlar da etkilenir. Hastaların %90'ını kadınlar oluşturmaktadır ve hastalığın klinik süreci alevlenme, kronik hastalık dönemi ve remisyondan oluşmaktadır. SLE ailevi geçiş gösterir. Diğer otoimmün hastalıklarla birlikteliği sık görülür. Bütün bunlar poligenetik faktörlerin etyolojide önemli rol oynadığını gösterir. HLA-DR2 ve HLA-DR3 pozitif olanlarda SLE görülme riski 3 kat artmıştır (47,48).

Patogenezinde hücre yüzey proteinleri ve dolaşımdaki proteinler ile tepkimeye giren otoantikorlar hastalığın çeşitli klinik tablolarından sorumludur. Bu otoantikorlar genellikle histon, nonhiston, RNA binding, sitoplazmik ve nükleer proteinlere karşı oluşur. ANA, anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) antikorlar, küçük nükleer ribonükleer proteinlere karşı antikorlar hastaların çoğunda pozitifdir. ANA, anti-dsDNA ve anti-Smith (anti-Sm) bu antikorlardan en önemlileridir. ANA, hastaların %95'inde mevcuttur. Anti-dsDNA hastalık için daha spesifiktir ve %50–60 oranında hastada saptanır. Anti-dsDNA titreleri zaman içinde ve hastalığın aktivitesine göre değişkenlik gösterirken, anti-Sm antikor düzeyleri ise genellikle sabit kalır (49,50).

SLE tanısı klinik ve laboratuvar bulgulara dayalı Amerikan Romatoloji Birliği'nin sınıflaması temel alınarak konulur. Anti-dsDNA ya da anti-Sm antikor pozitifliği SLE tanı kriterleri arasındadır (51,52).

2.3.3 Ankilozan Spondilit

AS başlıca sakroiliak ve vertabral eklemleri daha seyrek olarak da periferik eklemleri tutan, bunun yanında ekstraartiküler bulguları da olan kronik ve progresif seyreden bir romatizmal hastalıktır. AS çoğunlukla kas ve iskelet sistemini tutsa da kardiovasküler, pulmoner, renal, nörolojik, gastrointestinal sistem tutulumu da görülmektedir. AS'in klinik bulguları 15-30 yaşlar arasında nadiren akut başlayabilir. Erkek popülasyonda daha sık gözlenir. Etyopatogenezi net olarak bilinmemekle birlikte üzerinde en çok durulan konular genetik yatkınlık, çevresel etkenler ve enfeksiyonlardır. HLA-B27 antijeni ile AS arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur. AS'li hastaların %90'ı HLA-B27 pozitifdir ve HLA-B27 genetik riskin % 20-30'una katkıda bulunur. AS gelişiminde HLA-B27 dışında suçlanan birçok gen bölgesi mevcuttur. Spondiloartrit tanısı için spesifik tanısal test yoktur. RF ve ANA'nın negatif olması beklenir, HLA-B27'nin de tanısal değeri sınırlıdır. Klinik semptom ve radyolojik bulgularla hastalık tanı kriterleri oluşturulmuştur (53-58).

2.3.4 Skleroderma (Sistemik Skleroz)

Sistemik Skleroz (SSc), kollajen ve diğer bağ dokusu makromoleküllerinin deride ve çeşitli organlarda aşırı birikmesiyle doku fibrozu, küçük damarların proliferatif ve oklüzif vaskülopatisi ile tanımlanan, nedeni bilinmeyen, otoimmün bir bağ dokusu hastalığıdır. Patogeneizde immün aktivasyon ve vaskülopati önemlidir. Hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanmıştır. Hastalık en sık 30-50 yaşlarında ve sıklıkla kadın cinsiyette görülmektedir. Karakteristik cilt tutulumuna eşlik eden çeşitli derecelerde iç organ tutulumu görülür. Klinik tabloya halsizlik, çabuk yorulma ve kilo kaybı gibi sistemik semptomlar da eşlik edebilir. Hastalık alevlenme ve remisyonlarla seyretmektedir. Skleroderma klinik olarak sistemik ve bölgesel olmak üzere iki ana gruba ayrılır (59-62).

a) Sistemik Skleroderma

Sistemik skleroderma, hastalarda görünen bulgulara dayanarak CREST sendromu olarak da adlandırılır. CREST sendromu ismini bulguların baş harflerinden

almıştır. Bu bulgular: Kalsinoz kutis (Calcinosis) , Reynaud fenomeni (Reynaud's fenomenia), özofagal fonksiyon bozukluğu (Esophageal dysfunction), sklerodactili (Sclerodactyly), telanjiektazi (Telangiectasias). Sistemik Sklerodermanın 3 alt tipi vardır; yaygın (diffuse), sınırlı (limited) ve çakışan (overlap) (63).

b) Bölgesel (Lokalize) Skleroderma

Deriyi, çok nadir olarak deri altı dokularını tutan fakat iç organları tutmayan hastalık formudur (63).

SSc hastalarının yaklaşık %75'inde dolaşan otoantikoklardan bir veya daha fazlası bulunur. Bunlar topoizomeraz I (Scl-70), sentromer antijenler, fibrillarin, RNA polimeraz, PM-Scl, RNA I,II ve III antijenlerine karşı gelişmiş otoantikoklardır. Serolojik bulgular içinde en önemlisi ANA'nın sklerodermalı hastaların hemen hemen tamamında pozitif olmasıdır. Scl-70 antikokları SSc için oldukça özgüldür (% 98-100) ve interstisyel akciğer tutulumu için yüksek risk göstergesidir (64-67).

2.3.5 Sjögren Sendromu

Tükrük ve gözyaşı bezlerinin immün reaksiyonlar sonucu hasar görmesi ile oluşan ağız, göz ve mukozaların kuruması şeklinde kendini gösteren sistemik enflamatuvar bir hastalıktır. Salgı kanallarını etrafında mononükleer ve CD4(+) lenfosit infiltrasyonu görülmektedir. RA, SLE ve skleroderma gibi hastalıklarla bir arada görülmektedir. Özellikle 40 yaş üstü kadınlarda daha sık görülür. Üç gruba ayrılmaktadır: Primer Sjögren (Sicca) sendromu, Sekonder Sjögren sendromu ve RA ile beraber görülen 3. tip Sjögren sendromu. Primer Sjögren sendromu HLA-DW3 alleli ile ilişkilendirilmektedir. Sekonder Sjögren sendromu ise sicca sendromu, SLE, polimiyozit ile birlikte görülmektedir. Sjögren sendromunda %70'in üzerinde bir ANA pozitifliği ile beraber SS-A(Ro) ve SS-B(La)'ye karşı gelişen spesifik antikokların bulunması tanıda önem taşımaktadır (28,68).

2.3.6 Polimiyozitis/Dermatomyozitis

Polimiyozitis (PM) çizgili kaslarda enflamasyon, zayıflık ve ağrılarla karakterize, perivasküler sistem tutulumunun görüldüğü bir hastalık grubudur. Bu

durumun tipik deri dejenerasyonu ile birlikte görülmesine dermatomiyositis (DM) adı verilmektedir. Damar çevrelerinde CD4(+) T ve B lenfositlerinin infiltrasyonu görülmektedir. Hastaların ortalama %25'inde serumda t-RNA sentetaz enzimlerine karşı otoantikörler bulunur. Bunlardan birisi olan anti Jo-1 antikorunun özgülüğünün PM için yüksek olduğu bilinmektedir (28,68).

2.4. Anti nükleer antikorlar (ANA) ve Klinik Önemi

ANA kromatin olarak adlandırılan DNA-histon kompleksine, nükleer veya sitoplazmik ribonükleer proteinlere, çözülebilen hücresel reseptörlere, nükleolar ve sitoplazmik diğer yapılara karşı oluşan antikorların genel adıdır (69).

ANA ilk olarak 1948 de SLE'li hastaların kemik iliğinde LE hücrelerinde saptandı. LE hücresi, deoksiribonükleoproteine yönelik antikorun opsonin olarak etkisi sonucu, antikor ile sensitize olmuş nükleusun polimorf nüveli nötrofiller tarafından fagositozu sonucu oluşur. 1950'lerin sonunda IIF yönteminin geliştirilmesiyle ANA'nın daha duyarlı olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır (70).

Nükleer antijenik yapılara karşı oluşan otoantikörler genellikle IgG sınıfı antikorlardır. IgG tipi ANA, IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olarak dört alt gruba ayrılmıştır. Bu alt grupların antikorların spesifitesi ve hastalığın şiddeti ile olmasa da farklı IIF paternleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (69,71).

RA, SLE, Sjögren sendromu, skleroderma, sistemik skleroz, CREST sendromu, PM/DM, miks bağ doku hastalığı (MCTD: Mix connective tissue diseases) gibi bağ dokusu hastalıklarının (BDH) tanısında ve tedavisinin takibinde ANA büyük önem taşımaktadır. Fakat ANA'nın sadece pozitif olduğunun bilinmesi bir BDH tanısı için yeterli değildir ve tarama testi olarak kullanılmaktadır. Bazı ilaçlar da (prokainamid, hidralazin, fenotiyazinler, difenilhidantoin, izoniyazid ve kinidin gibi) ANA pozitifliğine yolaçabilir (69,72).

BDH dışında ANA'nın pozitif olabileceği durumlar Tablo 1 de özetlenmiştir.

Tablo 1. BDH dışında ANA'nın pozitif olabileceği durumlar (43)

<u>Romatizmal Hastalıklar</u> -Romatoid artrit -Sjögren Sendromu -SLE -Polimiyozitis/Dermatomyozitis -Skleroderma -MCTD -Vaskülitler	<u>Enfeksiyöz Hastalıklar</u> -Subakut Bakteriyal Endokardit -Tüberküloz -Enfeksiyöz Mononükleozis -Viral Hepatitler -Sifiliz -Lepra -Salmonelloz
<u>Maligniteler</u> -Lenfomalar -Lösemiler -Plazma Hücre Diskrazileri -Soliter Maligniteler(akciğer, meme)	<u>Hematolojik Hastalıklar</u> -İdiyopatik Trombositopenik Purpura -Otoimmün Hemolitik Anemi
<u>Karaciğer hastalıkları</u> -Kronik Aktif hepatit -Primer Biliyer Siroz -Otoimmün hepatit	<u>Akciğer hastalıkları</u> -İdiyopatik Pulmoner Fibrozis -Primer Pulmoner Hipertansiyon
<u>Endokrin Hastalıkları</u> -Tip 1 Diyabetes Mellitus -Graves Hastalığı	<u>Diğer nedenler</u> -Multible Skleroz -Son Dönem Böbrek Hastalığı -Kemoterapi ve Radyoterapi sonrası -Transplantasyon Sonrası -Sağlıklı bireyler

2.4.1 ANA Subtipleri

Nükleusta farklı yerleşim gösteren birçok antijene karşı gelişen antikorların genel ifadesi olan ANA, nükleik asitler, bazik histon proteinleri ve asidik nonhiston proteinlerine karşı gelişen antikorlar olarak 3 ana kategoriye ayrılmıştır (73).

a) Anti-dsDNA ve Anti-ssDNA:

Anti-dsDNA, DNA yapısındaki pürin ve pirimidin antijenlerine karşı, anti-single stranded DNA (anti-ssDNA) ise deoksiriboz iskeletindeki komponentlere karşı gelişen antikorlardır. Anti-ssDNA'nın daha sık görüldüğü ve herhangi bir hastalığa karşı spesifitesinin bulunmadığı bilinmektedir. Anti-dsDNA ise tek başına ve nadiren görülmekte SLE için yüksek spesifite göstermesine rağmen diğer BDH'da düşük

titrelerde bulunmaktadır. Anti-dsDNA antikorlarının titresi SLE'de hastalık şiddetiyle ilişkili olarak yükselmekte ve hastalığın takibinde büyük önem taşımaktadır (74,75).

b) Anti-Histon Antikorları:

Histonlar deoksiribonükleoproteini oluşturmak üzere DNA ile kompleks yapan temel nükleer proteinlerdir. Memelilerde H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak 5 alt gruba ayrılmıştır. Genellikle SLE, RA, ilaca bağlı lupus, sistemik skleroz ve MCTD hastalıklarında görülmektedir (76,77).

c) Anti-Sm ve Anti-RNP:

Sm ve Ribonucleic particle (RNP) antijenleri birbirlerine çok yakın, küçük nükleer RNA kompleksleridir. Bunlara karşı gelişen antikorların prekürsor mRNA'ların kesilmesi sırasında rol oynadığı, bu kesilme olayını inhibe ederek fonksiyonel mRNA oluşumunu engellediği bilinmektedir. Anti-Sm antikorları SLE hastalarında %5-30 oranında saptanabilmektedir. Anti-Sm SLE hastalarındaki yüksek spesifitesinden dolayı serolojik tanı kriterleri arasındadır. Anti-Sm antikorları genellikle anti-RNP ile birlikte görülmektedir. Anti-RNP, birçok BDH'da oluşabilmekte, yüksek titrelerde görüldüğünde MCTD için tanısal değer taşımaktadır (52,78,79).

d) SS-A (Ro) ve SS-B (La) Antikorları:

SS-A(Ro) ve SS-B(La) antikorları RNA polymerase III transkriplerini işleyen makromoleküler bir komplekse ait iki adet küçük nükleer RNP'dir. Bu antijenler hücre döngüsünün safhalarına göre nükleusta veya sitoplazmada bulunabilirler. Ro antijeni olarak da bilinen SS-A bir nükleik asit antijeni olmayıp sitoplazmiktir ve buna karşı gelişen antikorlar genellikle SLE ve Sjögren sendromunda görülmektedir. SS-B veya diğer adıyla La ise çözünebilir sitoplazmik RNA-protein antijenidir ve SLE'de görülmektedir. SS-A ve SS-B hücrenin fonksiyonlarına bağlı olarak sitoplazma ve nükleusta bulunabilmekte ve her iki antijen de polipeptitler üzerine yerleştikleri için tripsine duyarlılık göstermektedirler. SS-A substrat fiksasyon aşamasında bozulabildiği ve yıkama işlemi ile ortadan kaldırılabileceği için yalancı

negatifliğe yol açabilmektedir. Bu sebeple hücre kültürleri dondurulmuş dokulardan daha duyarlı kabul edilmektedir. SS-A'ya karşı antikorlar SLE hastalığının erken dönemlerinde tek başına, geç dönemlerinde ise SS-B'ye karşı gelişen antikorlarla bir arada bulunmaktadırlar. Anti SS-A antikorlarının C3 ve C4 eksikliği, subkutanöz lupus ve neonatal lupus ile ilişkili olduğu da bilinmekte, ayrıca primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit gibi hastalıkların yanı sıra sağlıklı kişilerde de bulunduğunu gösteren bulgular vardır. SS-A antikorları tek başına veya SS-B antikorlarıyla birlikte vaskülit, kriyoglobulinemi, lökopeni, anemi gibi hematolojik hastalıklar ve merkezi sinir sistemi hastalıklarıyla da ilişkilendirilmektedirler (74-76,80).

e) Anti Scl-70 ve Anti Sentromer Antikorları:

Scl-70'e karşı gelişen antikorlar ve anti-sentromer antikorları (ACA) nadiren bir arada bulunmaktadırlar. Scl-70 antijeninin temel kromozomal bir protein olduğu ve DNA topoizomeraz enziminin parçalanması ile ortaya çıkan ürünlerden biri olduğu bilinmektedir. Scl-70 antijenine karşı gelişen antikorların ise bu enzimin süpersarmal DNA üzerindeki açılma aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu antikor SSc hastaların %22-28'inde, hastalığın diffüz formunda ise %33 oranında saptanmıştır ve SSc hastalığının tanısı ve prognozunda önem taşımaktadır. Sentromer antijenleri üç tabakalı kinetokorun iç ve dış tabakalarında yer alan üç proteinden ibarettir. Anti sentromer antikorlarının ise sistemik sklerozun bir varyantı olan CREST sendromu için oldukça spesifik olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra bu antikorlar sistemik skleroz, primer Raynaud fenomeni, SLE, MCTD ve primer biliyer siroz hastalıklarında görülebilmektedir (76,80,81).

f) Nükleolusa Karşı Antikorlar:

Nükleolusa karşı gelişen antikorlar SSc başta olmak üzere SLE, Sjögren sendromu ve Raynold fenomeninde görülmektedir. İmmünofloresan boyama teknikleri ile nükleolar paternde boyanabilen birçok antikor gösterilmiştir.

Bu antikorların başında anti-RNA polimeraz I antikorları gelmektedir ve SSc hastaların %4'ünde görülmektedir. Bu antikor rRNA'nın öncül moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunda görevli RNA polimeraz I enzimine karşı

gelişmektedir ve IIF’de noktalı nükleolar boyanma göstermektedir.

Anti-fibrilların antikoru fibrilların antijenine karşı gelişmiştir. Sistemik skleroz için özgül olup hastaların %8’inde rastlanmaktadır. Bu antikorun varlığı kalp ve akciğer tutulumu ile ilişkili bulunmakta ve IIF’de kümeli nükleolar boyanma göstermektedir.

Bir diğer nükleolar antijen PM-Scl’nin işlevi tam olarak bilinmemekte ve pre ribozomal bir partikül olduğu düşünülmektedir. Buna karşı gelişen antikorların PM ve SSc ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu antikorlar IIF’de homojen nükleolar boyanma göstermektedir (71,76,80).

g) Nükleer/Sitoplazmik Antijenlere Karşı Oluşan Antikorlar:

Nükleer/sitoplazmik antijenler arasında Jo-1, PL-7, PL-12, Mi-1, Mi-2 ve Ku bulunmaktadır. Özgül aminoasit-tRNA sentetaz molekülleri olan Jo-1, PL-7 ve PL-12, protein sentezinde amino asitleri aktive ederek kendilerine uygun tRNA’lara bağlanmalarını sağlayan enzimlerdir. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar özellikle PM/DM hastalarında %4-30 oranında bulunmaktadır. Anti Mi-1 ve anti Mi-2 antikorlarının birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığı, DM ile yakın ilişkili olduğu bulunmuştur ve hastalığa özgü iki önemli marker olarak gösterilmiştir. Anti-Ku antikoru ise DNA’ya bağlanan p70/p80 nükleer protein çiftine karşı gelişmekte olup IIF’de yaygın benekli ve nükleolar boyanma göstermektedir. Anti-Ku antikorları SSc, PM ve SLE hastalarında sıklıkla görülmektedir (76,80,82,83).

h) PCNA’ya (cyclin= PL-5) Karşı Oluşan Antikorlar:

Nükleer hücre siklusunun S-fazına yönelik en önemli antijen olan proliferating cell nuclear antijen (PCNA) DNA replikasyonu ve tamirinde temel rol oynayan DNA polimeraz delta enzim kompleksinin bir faktörüdür. PCNA antijenine karşı gelişen antikorlar enzim aktivitesini inhibe etmektedir. SLE hastalarının %2-3’ünde pozitiflik saptanmaktadır (80,83).

i) Romatoid Artrit ile İlişkili Nükleer Antijene (RANA) Karşı Gelişen Antikorlar:

RANA'ya karşı gelişen antikorlar RF ile benzerliği bulunmayan IgG yapısında antikorlardır. Sadece Epstein Barr Virus (EBV) ile transforme hücrelerde görüldüğünden RA hastalığının patogenezinde EBV olasılığını desteklemektedir. SLE , diğer BDH'da ve normal bireylerde ise daha az sıklıkta görülmektedir (76,80).

j) Anti-Ma Antikorları:

SLE hastalarında saptanan anti-Ma antikorlarının hastalığın ciddiyetini ifade ettiği ve böbrek tutulumu, hipertansiyon, nörolojik hastalık, kompleman düzeyinde azalma, hepatosplenomegali, lenfadenopati ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Asidik bir protein olan Ma antijenin nefrit atağından hemen önce dolaşımında görülmeye başladığı bildirilmiştir (80).

2.4.2 Anti Nükleer Antikorların Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Otoimmün hastalıkların tanısında kullanılan ve çeşitli nükleer yapılara karşı gelişen otoantikorlar ANA başlığı altında toplanmaktadır. Günümüzde bunların tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler IIF ve ELISA yöntemleridir (84,85). Bu yöntemlerden bazıları:

- a) İndirekt İmmün Floresan Testi
- b) İmmünodifüzyon
- c) Counter İmmünoelektroforez
- d) İmmünoblot
- e) Radyoimmünopresipitasyon
- f) Radioimmünassay (RIA)
- g) ELISA

a) İndirekt İmmün Floresan Testi : ANA araştırılmasında en eski yöntemler arasında bulunan IIF hala kullanımdaki en yaygın ve altın standart olarak kullanılan yöntem olma özelliğini korumaktadır. Duyarlılık, uygulama kolaylığı ve

düşük maliyeti nedeniyle avantajlı görülmektedir (86).

IIF tekniğinde uygun substrat seçimi büyük önem taşımaktadır. Bir çok doku kesiti ve hücre kültürleri substrat olarak kullanılabilir. Substrat olarak çeşitli kaynakların kullanılması ve konjugatlar için belirlenmiş bir standardın bulunmaması önemli olumsuzluklarıdır. Değerlendirmenin tamamen yorumlayan kişinin bilgi ve deneyimine bırakılmasından dolayı laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası çalışmalar karşılaştırıldığında farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (69).

Günümüzde IIF testinde yaygın olarak Hep-2 hücreleri kullanılmaktadır. Bu hücrelerin büyük nükleusları bulunmakta ve hücre siklusu boyunca farklı şekillerde sergilenen antijenler saptanabilmektedir (69). Hücre çekirdeğinde gözlenen boyama paternlerine diğer konu başlığı altında yer verilecektir (Bkz. Bölüm 2.4.4)

b) İmmünodiffüzyon: Monospesifik bir prototip serum ile timus ve dalak doku ekstraktları kullanılmaktadır. DNA gibi büyük moleküllerin agarda diffüzyonu zayıf olduğu için bu yöntemle anti-DNA tayini zor gerçekleşmektedir. Klinik özellikleri SLE olan ancak IIF testi negatif olan hastaların serumları immünodiffüzyon yöntemi ile çalışıldığında ANA IIF testi negatif olmasına rağmen SS-A/Ro antijenlerine karşı gelişen antikolar pozitif sonuç verebilmektedir (87,88).

c) Counter İmmünoelektroforez (CIE): İmmünodiffüzyon tekniğine göre daha hassas olduğu bilinmektedir. DNA ve RNA gibi asidik antijenleri katodal (-) kuyucuğa, özgül antikoları ise anodal (+) kuyucuğa yerleştirilerek elektroforez işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde antijen kaynağı olarak kaba ekstratlar kullanılır, duyarlılığı kısmen yüksektir ve yükler sayesinde farklı antijenler kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Ancak basit antijenleri saptayamaması ve serumda en az 10 mg/ml antikora gereksinim duyması sınırlayıcı özelliklerindedir (88,89).

d) İmmünoblot: Western blot olarak da bilinen bu test çoğu otoantikorun tanımlanmasında kullanılan temel bir testdir. Western blot ile elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde ekstrakte edilen proteinler elektrotransfer yöntemi ile nitroselüloz içeren kağıtlara aktarılmaktadır. Bu nitroselüloz kağıtlar stripler halinde kesilir ve serum ile inkübe edilir (89).

e) Radyoimmünopresipitasyon: Bu yöntemde kültüre alınmış hücreler ³⁵S (proteinleri işaretlemek için) veya ³²P (nükleik asitleri işaretlemek için) ile inkübe edilmektedir. Daha sonra sentetik boncuklara bağlanmış hasta antikoları, işaretlenmiş antijenlerle bağlanmaktadır. Bu antijenler boncuklardan ayrılarak poliakrilamid jel üzerine dökülerek elektroforetik ortamda boylarına göre ayrıştırılmaktadır. Jelin radyografisi çekildiğinde otoradyografide işaretlenmiş ilgili antijenler bantlar şeklinde görülmektedir (82).

Radyoimmünopresipitasyon yöntemi yüksek düzeyde duyarlılık ve spesifite gibi birçok avantaja sahiptir. İmmünodifüzyon yöntemi ile karşılaştırıldığında Ro gibi küçük hücresel komponentlere karşı gelişen antikoların ve U1, RNP gibi antijenlere karşı gelişen antikoların belirlenmesinde çok daha duyarlı olduğu görülmüştür (90).

f) Radioimmünassay: Özellikle anti-DNA analizinde kullanılan bir yöntemdir. İki gruba ayrılmaktadır: Solid faz RIA ve Solubl faz RIA. Solid faz RIA tekniğinde antijen katı bir yüzeye kaplanmaktadır. Spesifik antikolar antijene bağlandıktan sonra, buna bağlanabilecek radyoaktif işaretli insan anti-globulin antikoru ortama eklenmektedir. Son aşama gama tayfölçer ile ortamdaki radyoaktivitenin belirlenmesidir. Hasta serumundaki antikor miktarı ise standard serum kullanılarak belirlenmektedir. Solubl faz RIA tekniğinde ise katı bir yüzey yerine ortam olarak solusyonlar kullanılmaktadır. Anti-dsDNA antikolarının belirlenmesinde kullanılan Fahr testi bu tekniğin prototipidir. Hasta serumundaki dsDNA antikoları ortamdaki işaretli DNA'ya bağlandıktan sonra ortama katılan NH₂SO₄ serbest haldeki DNA yerine antikora bağlanmakta ve antikorun bağlı bulunduğu DNA'yı çöktürmektedir. Çökelti miktarı hasta serumunda mevcut anti-dsDNA miktarı ile doğru orantılıdır. Son olarak çökeltinin radyoaktivitesi ölçülüp total radyoaktiviteye oranlanarak sonuçlar yüzde değerleriyle belirlenmektedir. Normal bir serumun DNA bağlama kapasitesi yaklaşık % 20 iken SLE'de bu oranın %100 olduğu bilinmektedir (82,88).

g) ELISA: İkinci antikorun bağlanmasına kadar uygulanan aşamalar solid faz RIA yöntemine benzemektedir. ELISA da ortama katılan ikinci antikor, radyoaktif

bir izotop yerine alkalin fosfataz veya peroksidaz gibi bir enzimle bağılı bulunmaktadır. Daha sonraki basamakta ortama eklenen substrat ile bu enzim reaksiyona girmekte ve renk açığa çıkmaktadır. Reaksiyon durdurulduktan sonra optik bir okuyucu ile rengin koyuluğu ölçülüp standart serumla karşılaştırma yapılarak kalitatif veya kantitatif bir sonuç verilmektedir (82).

ELISA yöntemi özellikle dsDNA ve ssDNA'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında anti-ekstrakte edilebilen nükleer antijen (anti-ENA) ve anti kardiyolipin antikorların belirlenmesinde de tercih edilmektedir. Pikogram ve nanogram düzeyinde sonuç verebildiği için RIA yönteminden daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca ELISA yönteminde total ANA tespiti de yapılmaktadır.

ELISA yönteminin duyarlılığı yüksektir. RIA'ya göre daha ucuz ve güvenilir olduğu bilinmektedir. Kısa zamanda daha çok hasta üzerinde çalışılabildiği için ve nükleus içinde yaygın halde bulunan ANA'ları daha kolay belirlediği için IFA yönteminden daha kullanışlı bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Ancak özgüllüğünün düşük olması nedeniyle yanlış pozitifliklere sık rastlanmaktadır (88,91).

2.4.3 Ekstrakte Edilebilen Nükleer Antijenler (ENA)

ENA, hücre nükleus parçalarının salın çözelti içinde işleme sokulmasından sonra saçılan proteinlere verilen genel bir isimdir. Bu proteinlerin içerisinde sitoplazmik antijenler de yer almaktadır. ANA başlığı altında toplanan hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer komponentlere karşı gelişen antikorlar; RA, SLE, Sjögren sendromu, PM/DM gibi SARD tanısında büyük önem taşımaktadır. Ancak bunlar; yaşlılık, kanser ve sitotoksik ilaç kullanımı gibi durumlarda da oluşabileceği için titre ve boyanma şekline dayalı pozitif ANA tarama testini mutlaka ENA testi takip etmelidir. Eğer ANA tarama testi negatif çıkarsa, diğer tanımlama testlerinin yapılmasına büyük ölçüde gerek yoktur (92,93).

ENA'ya karşı gelişen antikorlarının, BDH'da, hastalık tipinin belirlenmesi ve şiddetinin takibinde önem taşıdığı vurgulanmaktadır. Günümüzde 100'den fazla nükleer ve sitoplazmik ENA tanımlanmıştır. Rutin kullanıma bunlardan 6 tanesi

girmiştir. Nükleer antijenlerden nRNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 ile sitoplazmik antijen olan Jo-1 timüs, dalak ve hücre kültürlerinden serum fizyolojik ile ekstrakte edilebildiklerinden ENA olarak adlandırılmaktadır. Anti-ENA antikorları, floresan antikor, immünodifüzyon, ELISA ve IB yöntemleri ile tanımlanabilmektedir (84-94).

2.4.4 ANA IIF Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri

ANA IIF yönteminde nükleus ve sitoplazmik otoantikorlar, sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterir. ANA'lar genelde, hücre çekirdeğinde bulunan protein ve nükleik asitleri hedef almaktadır. İmmüno floresan paternler hücre devri ile ilişkili olarak Hep-2 hücrelerinde kendilerine özgü görünürler ve hücre siklusunun değişik aşamalarında eksprese olan antijenlere karşı oluşan otoantikorlar kolaylıkla saptanabilir. Mitoz esnasında sınırlı sayıda boyanma olurken çoğu patern interfaz esnasında görülür (89,95,96).

ANA pozitifliği 4 ana boyanma şekli ile görülmektedir: homojen, benekli, periferik ve nükleolar. Bu paternler belirli hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır.

Nükleusun tamamının aynı yoğunlukta boyanması ile homojen patern ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni deoksiribonükleoprotein, dsDNA, histonlar ve ssDNA'ya karşı gelişen antikorların homojen boyanma özelliği göstermesidir.

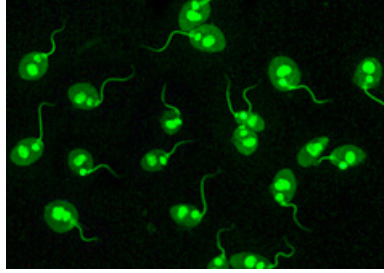
Benekli boyanma ise nükleusta dağılmış halde bulunan antijenlere karşı gelişen antikorlardan kaynaklanmaktadır ve büyüklük itibarıyla kaba benekli, ince benekli, kaba ve/veya ince benekli olarak farklı görünüşler vermektedir.

Periferik boyanma, nükleusun merkezi boyanmadığı halde çevresinin yoğun bir biçimde boyandığı paternidir. Bunun kondanse olmuş kromozomun etrafındaki metafazik hücrelere karşı gelişen antikorlarla oluştuğu bilinmektedir.

Nükleolar boyanma ise genellikle diğer boyanma şekilleriyle birlikte görülen karışık tipte bir floresan boyanmayı göstermektedir. RNAaz ve tripsine karşı duyarlı olması bu boyanmanın nükleolar RNA proteinine karşı gelişen antikorlarla

gerçekleştğini düşündürmektedir (69,96).

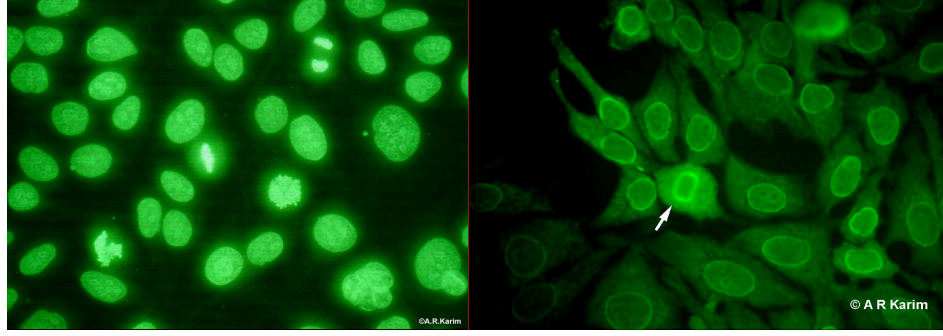
SLE tanısında büyük öneme sahip anti-dsDNA antikollarının saptanmasında, substrat olarak insanlar için patojen olmayan *Crithidia luciliae* hücreleri kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma, modifiye büyük bir mitokondri ve stabil halde sirküle dsDNA içeren kinetoplastlara sahiptir. *C. luciliae*, kültürü kolay yapılan bir parazittir ve kinetoplast DNA'sı, RNA ve nükleer proteinlerle ilişkili değildir. IFA testinin aksine bu yöntem anti DNA için %95'in üstünde bir spesifiteye sahiptir ve bu sebeple SLE tanısı için oldukça uygundur (97,98).



Şekil 3. İndirekt İmmün Floresan Test: *Crithidia luciliae* (99)

Homojen: Histon, dsDNA ve/veya nükleozomlara (histon ve DNA kompleksi) karşı otoantikolların varlığını gösterir. Bu boyanma şekli SLE, ilaçla indüklenmiş lupus, romatoid artrit, juvenile kronik artrit ve sistemik skleroz gibi hastalıklarda tespit edilebilir (96).

Nükleer Membran: Otoantikollar, nükleer membrandaki laminlere (A, B1, B2, C) gp120 gibi nükleer pore kompleks integral proteinlerine, laminle birlikte bulunan proteinlere (LAP 1A, LAP 2) karşıdır. Kronik hepatit, vaskülitler, trombositopeni, primer biliyer siroz ve SLE gibi mikstip kronik otoimmün hastalıklarda tespit edilirler. Çekirdeklerin birleştiği bölgelerde belirgin floresans vermektedir (100).



Homoijen

Nükleer Membran

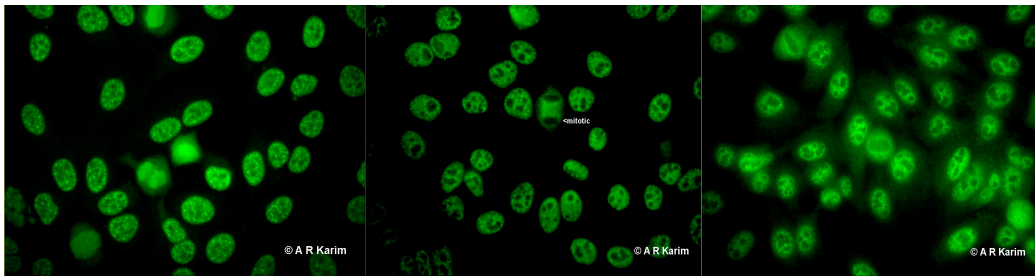
Şekil 4. Nükleer Membran ve Homojen Patern (99)

Benekli : Dört farklı benekli paterni gözlenir:

I. Büyük Benekli (Nükleer matriks): Otoantikorlar başlıca heterojen nükleer RNP'ye karşı olabilir, SLE, RA ve MCTD gibi hastalıklarda (hnRNP-A1, A2, B2) ve sklerodermada (hnRNP-C1, C2 ve I) görülmektedir.

II. Kaba Benekli: Sm ve U1-snRNP'e karşı oluşan otoantikor varlığında gözlenen bir boyanma modeli olup; MCTD ve SLE'de tesbit edilebilir.

III. İnce Benekli: Bu boyanmada antikorlar SSA/(Ro), SSB/(La), RNA Polimeraz II ve III, Ku, Ki ve Mi-2'ye karşı olabilir. SLE, Sjögren sendromu, skleroderma, PM ve MCTD gibi hastalıklarda gözlenir.



Nükleer Matriks

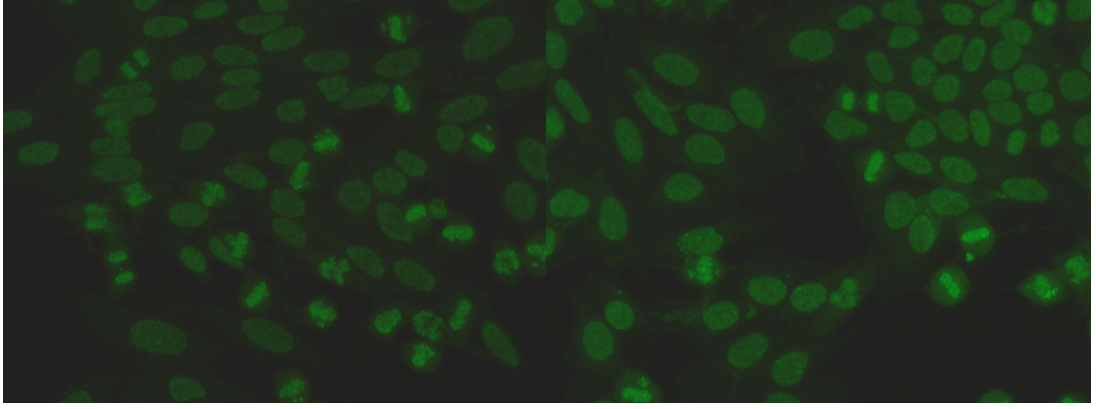
Kaba Benekli

İnce Benekli

Şekil 5. Nükleer Matriks, Kaba Benekli ve İnce Benekli Patern (99)

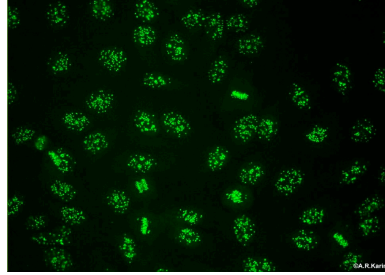
IV. Yoğun İnce Benekli: Antikor, ~75kd'luk lens epitelyum kaynaklı büyüme faktörüne (LEDGF) karşı olup, sağlıklı kişilerde, Alopesi Areata ve AD hastalarında görülebilmektedir. Hep-2 hücrelerinde saptadığımız boyanma paterni, interfaz çekirdekleri boyunca ve metafaz kromatini üzerinde düzgün yayılı ince

benekler olarak görülür (100-103). Çalışmamızdaki anti-DFS70 kamera görüntüleri (Bkz. Şekil 6).



Şekil 6. Anti-DFS70 Patern

Sentromer: Bu antikolar sentromer protein A,B,C (CENP) ve daha nadir olarak CENP- D'ye karşıdır. CENP-F antikoları bu boyanma şeklini göstermezler. Sentromer boyama şekli CREST sendromu, primer biliyer siroz, Raynoud fenomeninde saptanabilir.



Şekil 7. Sentromer Patern (99)

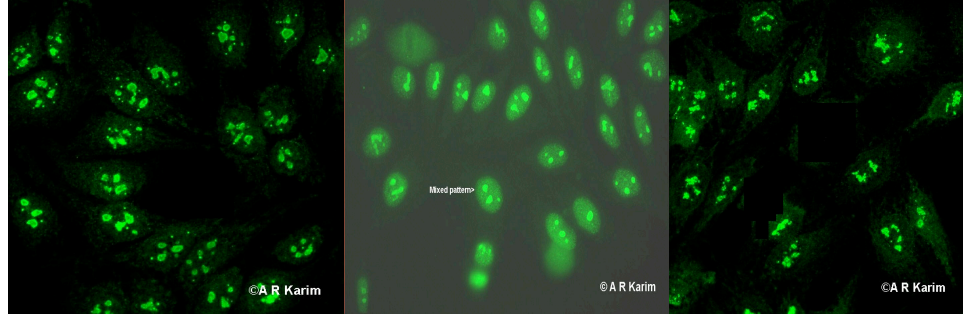
Nükleolar:

I. Nükleolar Homojen: Bu boyanma şekli anti Th/To antikoları olarak bilinir ve 40kDa'luk iki küçük ribonükleoproteine karşı olduğunda gözlenebilirler. Th/To antikoları SSc, SLE, PM ve RA'da saptanabilir.

II. Nükleolar Küme: Sistemik sklerozis için yüksek spesifikle

hastaların %5'inde ve pulmoner hipertansiyonda görülür.

III. Nükleolar Benekli: SLE, RA ve MCTD'de de gözlenen RNA Polimeraz I kompleksine karşı oluşan antikorları gösterilebilir (100-103).



Şekil 8. Nükleolar Küme ,Nükleolar Homojen ve Nükleolar Benekli Paternleri (99)

2.4.5 ANA IIF Testinde Hücre Sitoplazmasında Gözlenen Boyanma Şekilleri

Sitoplazmik İnce Benekli: Aminoasıl-tRNA sentetazlara (jo-1, PL7, PL12) karşı olup otoimmün miyozitis (PM/DM, overlap sendromunda miyozitis, BDH) için diyagnostik belirteçtir. Anti Jo-1 (histidil-tRNA sentetaz) ve anti-EJ (glisil- tRNA sentetaz) antikorları klinik miyozit gelişmeden 5 ay önceden tespit edilebilmektedir (104,105).

Sitoplazmik Büyük Benekli: Boyanma sitoplazmaya yayılmış olup lizozom ve endozom gibi organellere karşı otoantikorları gösterir.

Sitoplazmik Kaba Benekli İpliksi (Mitokondri): Boyanma çoğunlukla M2'ye karşı gözlenir ve primer biliyer siroz, diğer kronik karaciğer hastalıkları, SLE ve SSc 'de görülebilir.

Sitoplazmik Homojen: Otoantikorlar ribozomal P fosfoproteinlerden PO, P1 ve P2'ye karşı ve diğer antijen hedefleri 28S tRNA , S10, JA, L12 ve L5/5S'ye karşı oluşurlar. Bazen dsDNA antikorlarının yokluğunda SLE'li hastaların %10-20'sinde

tesbit edilebilirler.

Sitoplazmik Golgi: SLE, Sjögren sendromu ve diğer SARD hastalarında saptanabilir. Sitoplazmanın perinükleer bölgesinde düzensiz granüler boyanma ile karakterizedir.

Sentriol: Skleroderma, CREST, ve Sjögren sendromu ve diğer otoimmün hastalıklarda saptanabilir.

Midbody: Mitotik hücrelerin midbody kısmında bulunan proteinler olup çoğu tam olarak tanımlanamamıştır, bu otoantikor SSc ve Raynaud fenomeninde görülebilmektedir (96,100).

2.5 Anti-DFS70 Otoantikorları

Tipik DFS IIF boyanma paterni interfaz çekirdekleri boyunca ve metafaz kromatini üzerinde düzgün yayılı ince benekler olarak görülür. Bu boyanma şekli, belirgin bir şekilde homojen ve yoğun ince benekli boyanma tipinden ayırt edilebilmektedir. Antijen moleküler ağırlığına göre DFS70 olarak adlandırılmıştır, ancak antijenin birincil hedefi olan lens epitelinde türevli büyüme faktörü ve transkripsiyon koaktivatör p75 olarak da adlandırılmaktadır. Önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olan, rutin ANA IIF taramasında sıkça saptanan ama aynı zamanda kesin olarak otoimmün hastalıklarla ilişkisi tam olarak bilinmeyen bir otoantikor olarak tanımlanmaktadır. DFS70 antijeninin timusta, diğer dokulardan daha fazla eksprese edildiğini gösterilmiştir (95,101,106).

DFS70/LEDGF prostat tümör dokusunda yüksek oranda bulunur ve fizyolojik işlevi olarak viral integras ile bir etkileşim sayesinde, insan bağışıklık sistemi bozucu virüsün çoğalması için bir kofaktör olarak görev alır. DFS70/LEDGF antijeninin ekspresyonunun; endoplazmik retikulum stresi nedeniyle arttığı da ileri sürülmüş ve DFS70/LEDGF antijeninin baskın olarak bazal epidermal hücrelerin nükleusunda bulunduğu ve farklılaşma sırasında sitoplazmaya geçtiği belirtilmiştir (5,103,107).

Antijenik yapının lokalizasyonundan daha da önemli olan bu antijene karşı oluşan otoantikörün klinik önem taşıyıp taşımadığıdır. Anti-DFS70 otoantikörünün doğal bir otoantikör olduğu ve sağlıklı bireylerde hiçbir antijen uyarımı olmaksızın bulunduğu da ileri sürülmüştür (101).

Ganapathy ve ark.(95)'nin anti-DFS70 otoantikörü üzerine yaptıkları çalışmada hedef antijen için farklı bir hipotez öne sürmüşlerdir. Bu hipoteze göre normal öz antijenler immünojenik özellik kazanıp, kendilerine otoantikör cevabı oluşmasını sağlayarak otoimmün hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Hipotezde, hücrelerin ölümü sırasında, hücrenin kendi otoantijenleri modifiye olarak immünojenik özellik kazanmaktadır. Hücre ölümü sırasında (apoptoz, primer nekroz veya sekonder nekroz) hücre içi öz antijenler fragmanlara ayrılmakta ve bu fragmanlar normal fonksiyonlarını kaybederek, patojenik özellik kazanmaktadır.

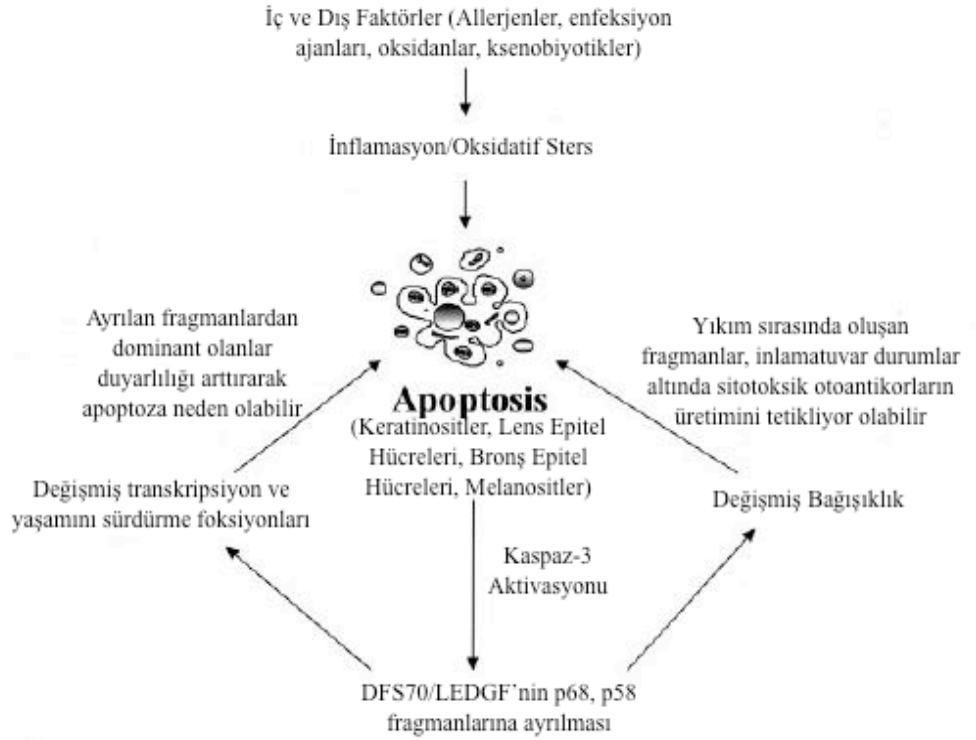
Hipoteze göre, memeli hücrelerinin büyümesini destekleyen ve hücrenin yaşamını devam ettirmesini sağlayan bir otoantijen olan LEDGF/p75 de apoptoz sırasında kaspaz3 ve kaspaz7 enzimleri fragmanlarına ayrılmakta (p65 ve p58 fragmanları) ve bu otoantijen normalde hücre ölümü sırasında oluşan strese karşı hücreleri korurken, oluşturduğu fragmanlarla tam ters etki yapmaktadır. LEDGF/p75, apoptoz sırasında fragmanlarına ayrıldığında, oluşan fragmanlar, apoptozu arttırıcı özellik kazanmakta veya dentrik hücreleri tarafından lenfositlere sunulurken bu fragmanlara ve LEDGF/p75'e karşı otoantikör oluşumuna neden olmaktadır.

Hipoteze göre iç ve dış faktörler nedeniyle (allerjenler, enfeksiyon ajanları, bozulmuş immün sistem vs.) keratinosit, lens epitelyum ve bronş epitelyum hücrelerinde apoptoz başlamakta ve oluşan öz antijen fragmanları, ya apoptozu arttırıcı etki göstermekte yada immünojenik özellik kazanıp otoantikör üretimine neden olarak yine apoptozu arttırmaktadır.

Ganapathy ve ark.(95) LEDGF antijeninin bir öz antijen olduğunu ve hücrelerin yaşadığı streslere karşı onları koruyucu bir fonksiyonu olduğunu, bu fonksiyonunu ise stres karşısında, Hsp27, alfaB-crystallin, Hsp90 ve AOP2 gibi proteinleri aktive ederek yaptığını ileri sürmektedirler.

DFS70/LEDGF'nin hücrel değişiklikler üzerinde TGFb1'in uyararak önemli rol oynadığı gösterilmiştir. TGFb1 in hücre apoptozu üzerinde düzenleyici etkisiyle hücre proliferasyonunda ve yaşamında düzenleyici genlerin ortasında yer almaktadır (1).

Daha ileri çalışmalarda DFS70/LEDGF'nin HIV-1'in hücre genomuna integrasyonunda rol alan konak genlerden biri olduğu gösterilmiştir (5).



Şekil 9. Anti-DFS70/LEDGF otoantikorunun otoimmün inflamatuvar hastalıkların patogenezinde olası katkısını gösteren model (95).

Dellavance ve ark. (6) IIF ve immunoblotting ile 10.000 ANA pozitif örnek üzerinden yaptıkları değerlendirmede anti-DFS70 antikorların ANA pozitif olan ve hiçbir SARD kanıtı içermeyen bireyler arasında yaygın olduğunu bildirmiştir. Bu otoantikoru taşıyan otoimmün hastaların yarısından fazlasında otoimmün tiroidit bulunmaktadır.

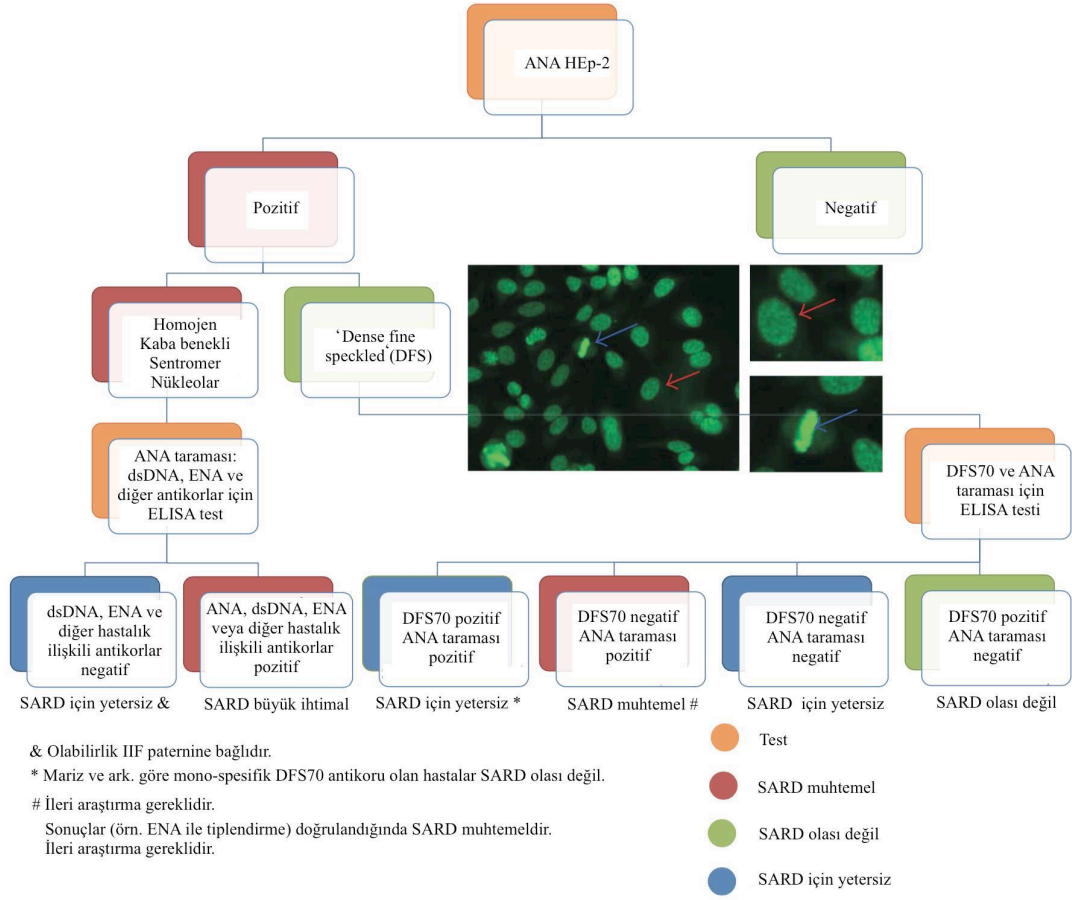
DFS70 antikorunun erkeklere göre kadınlarda daha sık rastlandığı

görülmüştür. Cinsiyet farklılığında, salgılanan hormonların etkili olduğu düşünülmektedir (108).

Şimdiye kadar anti-DFS70 otoantikoru farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Anti-DFS70 antikorlarının Vogt-Harada sendromu (% 66.7), AD'de (30%), sağlıklı bireylerde (~% 10) bunu takiben SARD'da sıklığı anlamlı olarak daha düşük (~ % 2-3) bildirilmiştir (101,109,110).

Muro ve ark. (106)'nın yaptığı araştırma sonucunda, sağlıklı bireylerin %10'un da anti-DFS70 antikoru saptanırken, SARD bireylerinin çok düşük bir yüzdesinde saptanması, bu otoantikoronun belki de, o bireyin romatolojik hastalığa sahip olmadığını gösteren bir belirteç olduğunu ve hatta bu otoantikoron otoimmün romatolojik hastalıklara işaret etmemekle beraber, herhangi bir hastalık ile de ilişkisinin olmayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

HEp-2 hücreleri ile gerçekleştirilen IIF yöntemi, SARD otoantikor hedef antijenlerinin tespitinde yüksek verimliliği ve ekonomik oluşuyla immun analizler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Anti-DFS70 antikorları çeşitli saptama teknolojileriyle tespit edilebilmektedir. Bunlar; IFAT , IB, ELISA, “addressable laser bead assay” (ALBIA: Adresli laser boncuk tahlili) ve özgün kemilüminisens yöntemleridir. Anti-DFS70 antikorların saptanması için yakın zamanda geliştirilmiştir bir strateji de immünoadsorpsiyon IIF deneyidir. Bu yöntemde rekombinant DFS70 antijeni ihtiva eden tampon maddesi kullanılmaktadır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada ANA pozitif sağlıklı bireylerde IIF DFS70 paterni %33.1 , ANA pozitif SARD bireylerinde ise %0 olarak saptanmıştır ($P < 0.0001$). Sonuç olarak anti-DFS70 antikorların tespiti için geliştirilen yeni immünoadsorpsiyon yöntemi ile gereksiz ek testlerin ortadan kaldırılmasıyla maliyet etkinliği sağlandığı vurgulanmıştır (111-113).



Şekil 10. Karakteristik Boyanma Paternleri ve Anti-DFS70 Antikorları İçin Önerilen Test Algoritması (114).

Karakteristik yoğun ince benekli interfaz hücre boyanma modeli kırmızı okla belirtilmiştir. Metafaz hücrelerindeki güçlü kromozomal boyanma mavi okla gösterilmiştir. DFS paternli örnekler anti-DFS70 antikorlu açısından ANA tarama ELISA yöntemiyle doğrulanmalıdır. ANA taraması negatif, anti-DFS70 antikorlu pozitif bulunan hastalar SARD tanısı açısından düşük olasılıklı olarak değerlendirilmektedir (114).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Kontrol Grubu Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Araştırmada kullanılan insan kontrol grubu serum örnekleri, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Merkezi Laboratuvarına kan bağıışı yapan sağlıklı donörlerden oluşmaktadır. Bağışlanan donör kanları yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin rastgele seçildi. Bu çalışma için Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan izin alındı ve her gönüllüye bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dolduruldu (2014-60). Gönüllü onamı alınan 507 kişi çalışmaya dahil edildi. Serolojik olarak HbsAg, Anti HCV, HIV Ag/Ab ve Sifiliz VDRL testleri negatif bulunan serum örnekleri çalışmada kullanıldı. Donör ön bilgi formu değerlendirmesinde kronik hastalık ve ilaç kullanım öyküsü açısından sorgulandı. Alınan her bir serum örneğinden 1000 mikrolitre eppendorf tüplerine ayrıldı ve çalışma gününe kadar -40 °C derin dondurucuda saklandı.

3.1.2 Romatoloji Polikliniğine Başvuran SARD Bulunan Grup

Bu çalışmaya romatoloji polikliniğine başvuran ve rutin değerlendirmede ANA IIF bakılan 3224 hasta dahil edildi. Hasta tanı gruplarından 418'i RA, 43'ü AS, 101'si SLE, 36'sı SSc, 71'ı Sjögren sendromu ve 2555'si BDH ön tanısı konan hastalardan oluşmaktaydı. Bu tanı grupları içerisinde IIF testinde anti-DFS70 paterni pozitif çıkan hastalar gönüllü olur formu doldurularak çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen her bir hastadan 1000 mikrolitre serum örneği eppendorf tüplerine ayrıldı ve çalışma gününe kadar -40 °C derin dondurucuda saklandı.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri; derin dondurucu (Sanyo Biomedical Freezer marka, -40 °C'lik), floresan mikroskop (EuroStar II, Zeiss marka, Almanya), santrifüj (Heraus marka), karıştırıcı (FALC INS. Mix 20 marka), 10-100 µl ve 100-1000µl'lik ayarlanabilir otomatik pipetler (HTL marka),

çalkalayıcı (BIOSAN Mini Rocker marka), Euroimmun EUROBlot Master, Canon marka tarayıcı ve buzdolabıdır.

Değerlendirme Zeiss marka floresan mikroskopta yapıldı. Anti-DFS70 paternine ait ANA IIF görüntüleri Lumenera marka kamera ile çekildi. Çalışmada kullanılan kitler:

1. ANA IIF kiti (EUROIMMUN, ALMANYA)
2. ANA Profile 1 ENA kiti (EUROIMMUN, ALMANYA)
3. İnsan PC4 ve SFRS1 etkileşimli protein 1 (PSIP1) ELISA kiti (CUSABIO , ÇİN)

3.2 Yöntem

3.2.1 İndirekt İmmün Floresan (IIF) Yönteminin Uygulanması ve Prensibi

IIF testi invitro bir test tekniği olup, hücre çekirdeğinde ve hücre sitoplazmasında bulunan antijenik yapılara karşı oluşmuş otoantikörleri saptama yöntemidir. Yöntemin sonuçları hem kalitatif hemde kantitatif olarak saptanabilmektedir.

Prensip: Serum inkübasyonu sırasında, hasta serumunda var olan antikörler, slayt üzerindeki doku kesitlerinde veya fikse edilmiş hücrelerde bulunan ilgili antijenlere bağlanırlar. İnkübasyonu takiben gerçekleştirilen yıkama aşamasında bağlanmayan antikörler ve serum içeriği ortamdan uzaklaştırılır. Yıkama aşamasını takiben, ikinci kat, fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge antikör olan anti-IgG antikörleriyle aynı doku alanları inkübe edilir. İlk inkübasyonda test serumundaki antikörler antijenlere bağlandı ise, bağlanan antikora ikinci kat işaretli antikör de bağlanacaktır. Eğer ilk inkübasyonda hasta serumunda ilgili antikörler yok ise, konjugat inkübasyonunda herhangi bir bağlanma olmayacaktır. Konjugat inkübasyonunu takiben slaytın yıkama işlemi tekrarlanır ve bağlanmamış fazla IgG konjugat slayt üzerinden uzaklaştırılır. Yıkama aşamasını takiben kit içeriğinde bulunan 'embedding medium' (kapatma medyumu) ile slaytların üzerine lameller

kapatılır ve floresan mikroskopta değerlendirme yapılır.

3.2.1.1 Floresan ANA IIF Testinin Çalışılması:

1. ANA IIF kiti, +4 °C'lik buzdolabından ve çalışılacak serum örnekleri -40 °C'lik derin dondurucudan en az 40 dakika önceden, oda sıcaklığına ulaşması için çıkartıldı. ANA IIF kit içeriğinde bulunan ve test aşamasında kullanılacak tüm içerik oda sıcaklığına getirildi.

2. Oda sıcaklığına ulaşan serum örnekleri vortekslenerek karıştırıldı.

3. Kit içeriğinde bulunan PBS (Fosfat Tuz Tamponu) (pH 7.2), 1L distile su içerisinde iyice karıştırıldı.

4. Elde edilen PBS çözeltisine yine kit içeriğinde bulunan 1 tüp tween 20 solüsyonu eklendi ve homojen dağılabilmesi için karışım kabı yavaşça altüst edildi. Tween 20 deterjan yapısında bir solüsyon olup hızlı çalkalamalarda köpürmeye sebep olduğundan karıştırma işlemi yavaşça yapıldı (Hazırlanmış olan PBS-Tween 20 karışımı bu test çalışmasında ve yıkama aşamalarında kullanılacak ortak karışımdır).

5. Hasta listesi önceden hazırlandı ve dilüsyon tüpleri numaralandırıldı. Üretici firmanında önerdiği gibi başlangıç dilüsyonu 1:100 dilüsyonları yapıldı. 1:100 dilüsyon oranı elde etmek için 10 µL serum örneği 990 µL PBS-Tween 20 karışımı içeren polistiren tüpe eklendi.

6. Dilüe edilen serum örnekleri tekrar vortekslendi.

7. Dilüe edilen serum örneklerinden alınan 25 µL, inkübasyon tepsisi olarak adlandırılan numaralı hasta alanlarına sırası ile pipetlendi. Hücre ve doku içeren slaytlar bu inkübasyon tepsilerinin üzerine kapatılarak, serum inkübasyonu başlatıldı.

8. İnkübasyon oda sıcaklığında, direkt güneş ışığından uzak bir şekilde 30 dakikada tamamlandı.

9. İnkübasyon sonrası slaytlar, PBS-Tween 20 karışımı ile doldurulmuş yıkama küvetlerine kondu. Bu küvetlere konmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı döküldü ve slaytlar hemen yıkama küvetine konuldu. Her bir yıkama küvetine maksimum 5 slayt konarak yıkama yapıldı.

10. Yıkama küvetinde 5 dakika tutulan slaytlar, bu süre sonunda yeni bir yıkama küvetine aktarılarak 5 dakika daha yıkandı.

11. Bu aşamada yeni inkübasyon tepsileri hazırlandı. Hasta sayısı kadar alana bu defa kullanıma hazır IgG konjugat (20 mikrolitre) pipetlendi.

12. Slaytların sadece arka yüzeyi silinerek konjugat pipetlenmiş inkübasyon tepsilerinin üzerine kapatıldı ve 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon doğrudan güneş ışığı almayan bir ortamda gerçekleştirildi.

13. Konjugat inkübasyonu tamamlandıktan sonra slaytlar, PBS- Tween 20 karışımı ile doldurulmuş yıkama küvetlerine kondu. Bu küvetlere konmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı döküldü ve slaytlar hemen yıkama küvetine kondu. Her bir yıkama küvetine maksimum 5 slayt konarak yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sürerken, kit içeriğinde bulunan lameller, inkübasyon tepsilerinin altında bulunan köpük alana yerleştirildi ve her bir hasta alanına denk gelecek şekilde, yine kit içeriğinde bulunan kapatma medyumu damlatıldı.

14. Yıkama işlemi bittikten sonra slaytların sadece arka yüzeyi silindi ve üzerine lameller kapatıldı.

15. Slaytlar, bu şekilde mikroskopik değerlendirmeye hazırlandı.

3.2.1.2 Floresan Mikroskop Değerlendirmesi

ANA'lara karşı oluşmuş otoantikörlerin değerlendirilmesinde Zeiss marka floresan mikroskop kullanıldı. Değerlendirmede 40x objektif kullanıldı.

IIF çalışma tekniği ile inkübe edilmiş slaytlar mikroskopta gösterdikleri

boyanma şekilleri açısından değerlendirildi. ANA negatif örneklerde hücrelerin nükleusunda ve sitoplazmasında belirgin floresan gözlenmezken pozitif örneklerde hücre çekirdeğine ve sitoplazmasına karşı oluşmuş otoantikolar mevcutsa, çok çeşitli ve bazen karakteristik boyanma şekilleri gözlenir.

Hücre çekirdeği ve sitoplazmasında oluşan boyanma şekillerinin değerlendirmesinde Hep-20-10 hücrelerinin bulunduğu alan kullanılmıştır. Maymun karaciğerine ait ikinci doku alanında ise ek değerlendirme yapılmıştır. Hep-2 IIF testinde, Hep-20-10 hücrelerinin yanı sıra, ikinci bir doku olan maymun karaciğerinin bulunmasının sebebi; Hep-20-10 hücrelerinin olduğu alandaki boyanma şekillerinin konfirmasyonunu yapabilmek ve varsa farklı bir boyanma şeklini (otoantikorun varlığını) saptayabilmektir.

Mikroskop değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar hasta listesine kaydedildi. Pozitiflikler, floresan şiddetine göre sınıflandırıldı.

3.2.2 Ektrakte Edilebilen Nükleer Antijen (ENA) Yöntemi Uygulaması ve Prensibi

IIF ANA testinde DFS70 paterni şüpheli saptanan serum örnekleri IB testi ile diğer paternler ile birlikteliği açısından test edildi. ENA testi Euroimmun firmasına ait Euroline kiti kullanılarak yapıldı. Bu kit immunblotting prensibine göre üretilmektedir. Testte kullanılan her bir strip nRNP/Sm (U1-nRNP), Sm, SS-A, Recombinant Ro-52 (Ro-52, 52kDa), SS-B, DNA-Topoisomerase I (Scl-70), PM-Scl, Histidyl- tRNA synthetase (Jo-1), CENP B, dsDNA, nucleosome, Histones, Pyruvate dehydrogenase complex (AMA-2) antijenlerini içermektedir. Test üzerindeki antijenler, insanda IgG sınıfında bulunan otoantikoların kalitatif değerlendirilmesini yapabilecek nitelikte bulunmuştur. İlk reaksiyon basamağında 1:100 oranında dilüe edilmiş hasta serumları immünblot striplerle inkübe edildi. İnkübasyon için firma tarafından sağlanan EUROBlot Master küvet kullanıldı. Test üzerindeki herhangi bir antijene karşı antikor varsa (pozitiflik), spesifik IgG antikorları (IgA ve IgM dahil) karşılığı olan bölgeye bağlanmaktadır. Bağlı antikorları saptamak için renk reaksiyonu oluşturma kapasitesi olan insan IgG (enzim konjugat)

işaretli enzim ile ikinci bir inkübasyon yapıldı. Sonuçlar çıplak gözle ve Eurolinescan programı ile bilgisayar ortamında değerlendirildi.

3.2.3 Anti-DFS70 Sandwich ELISA Yönteminin Uygulanması ve Prensibi

İnsan PC4 ve SFRS1 etkileşimli protein 1 (PSIP1) serum konsantrasyonlarının plazma, doku homojenatları , hücre lizatlarını nicelik olarak belirlemek için geliştirilen bu kit ile DFS70 antijenine karşı gelişen antikorların sandwich ELISA yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır. Test PSIP 1'e özgü antikor ile kaplı kuyucukları içemektedir. Antijen içeren standartlar ve serum örnekleri kuyucuk içerisine pipetlenerek PSIP 1'e karşı mevcut olan antikora bağlanır. Yıkama işleminden sonra PSIP 1 için biyotin- konjuge antikor ilave edilir. Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra konjuge avidin Horseradish Peroxidase (HRP) ilave edilir ve inkübasyona bırakılır. Yıkama işlemiyle bağlanmayan avidin-enzim reaktifleri uzaklaştırıldıktan sonra substrat solüsyonu kuyucuklara eklenerek bağlanmış PSPI 1 miktarı ile orantılı olarak biotin-conjuge antikor ve enzim konjuge Avidin ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği olur. Enzim substrat reaksiyonu sülfirik asit solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve oluşan renk değişimi 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Saptama aralığı : 46.88 pg/ml-3000 pg/ml'dir.

Sadece araştırmalarda kullanılmak için üretilen bu kit ile saptanabilen minimum insan PSIP 1 dozu <11.72 ug / ml'dir.

Bu deney insan PSIP 1 saptanması için yüksek duyarlılık ve mükemmel bir spesifiteye sahiptir. İnsan PSIP1 antikorları ve analogları arasında herhangi bir önemli çapraz reaktivite veya interferans gözlenmemektedir.

Tablo 2. Kit içeriği

Reaktifler	Miktar
Deney Plakası (12 x 8 kaplanmış Mikrokuyucuk)	1(96 kuyucuk)
Standart (Freeze dried)	2
Biotin-antibody (100 x konsantre)	1 x 120 µl
HRP-avidin (100 x konsantre)	1 x 120 µl
Biotin-antibody Diluent	1 x 15 ml
HRP-avidin Diluent	1 x 15 ml
Örnek Diluent	1 x 50 ml
Yıkama Tamponu (25 x konsantre)	1 x 20 ml
TMB Substrate	1 x 10 ml
Durdurma Solüsyonu	1 x 10 ml
Yapıştırıcı Şerit (96 kuyucuk için)	4
Kullanım Klavuzu	1

Gerekli Diğer Malzemeler:

- 450 nm dalga boyunda 540nm ve 570 nm arası ölçüm yeteneğine sahip spektrofotometre.
- İnkübatör 37°C±0.5°C.
- Püskürtme şişesi , manifoldu dispanser, veya otomatik mikropalak yıkayıcı.
- Plaka için kurutma kağıdı.
- 100 mL and 500 m dereceli ölçüm silindiri.
- Deiyonize veya distile su.
- Pipet ve pipet uçları.
- Dilüsyon için test tüpleri.

Reaktiflerin Hazırlanması:

Tüm kit içeriği ve örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına (18 - 25°C) getirilir.

1. Standart hazırlanması: 1 mL sample dilüent ile standart çözülür, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir, köpük oluşturulmadan dikkatlice karıştırılır. Bu hazırlanmış standart stok solüsyonunun konsantrasyonu 3000 pg/mL olur. 7 temiz tüp alınır ve 250'er µL sample dilüent dağıtılır, üzerine hazırlanmış stok standart solüsyonundan 250'er µL eklenerek seri konsantrasyonlarda standart oluşturulur. Standart konsantrasyonları 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75 ve 46.88 pg/mL olur. İlave olarak kör için kullanılmak üzere 250 µL standart dilüent ayrı bir tüpe alınır.
2. Biotin-antibody(1x): Biotin antibody dilüent ile 100 kat dilüe edilir..
3. HRP-avidin(1x): HRP avidin dilüent ile 100 kat dilüe edilir.
4. Yıkama Solüsyonu: Wash Buffer (25x Konsantre) 20 mL alınıp 480 mL distile su ile seyreltilir. 1x yıkama solüsyonu elde edilmiş olur.
5. Örneklerin hazırlanması: Örnekler çözüldükten sonra vortekslenerek kullanıma hazır hale getirilir.

Test Prosedürünün Özeti

- Reaktiflerin hazırlandı.
- 100µl standart ve serum örnekleri kuyucuklara yerleştirildi. 2 saat 37°C de inkübe edildi.
- Sıvı kuyucuklardan uzaklaştırıldı (yıkama yapılmaz).
- 100µl Biotin- antibody kuyucuklara yerleştirildi. 1 saat 37°C de inkübe edildi.
- Aspirasyon ve 3 kez yıkama yapıldı.
- 100µl HRP-avidin kuyucuklara yerleştirildi. 1 saat 37°C de inkübe edildi.
- Aspirasyon ve 5 kez yıkama gerçekleştirildi.
- 90µl TMB Substrat kuyucuklara yerleştirildi ve 15-30 dakika 37°C de ışıktan koruyarak inkübe edildi. Substrat solüsyonu eklendiğinde kuyucuklardaki renk maviye döndü.
- 50µl durdurma solüsyonu kuyucuklara eklenerek Plak Biotech marka yarı otomatik mikropalak okuyucuda 450 nm'de 5 dakikada okutuldu. Sonuçlar aynı çalışmada analiz edildi ve pg/mL cinsinden hesaplandı.
- Üretici firma önerileri doğrultusunda sonuçlar Curve Expert 1.3 yazılımı ile değerlendirildi.

3.2.4 İstatistiksel Analiz

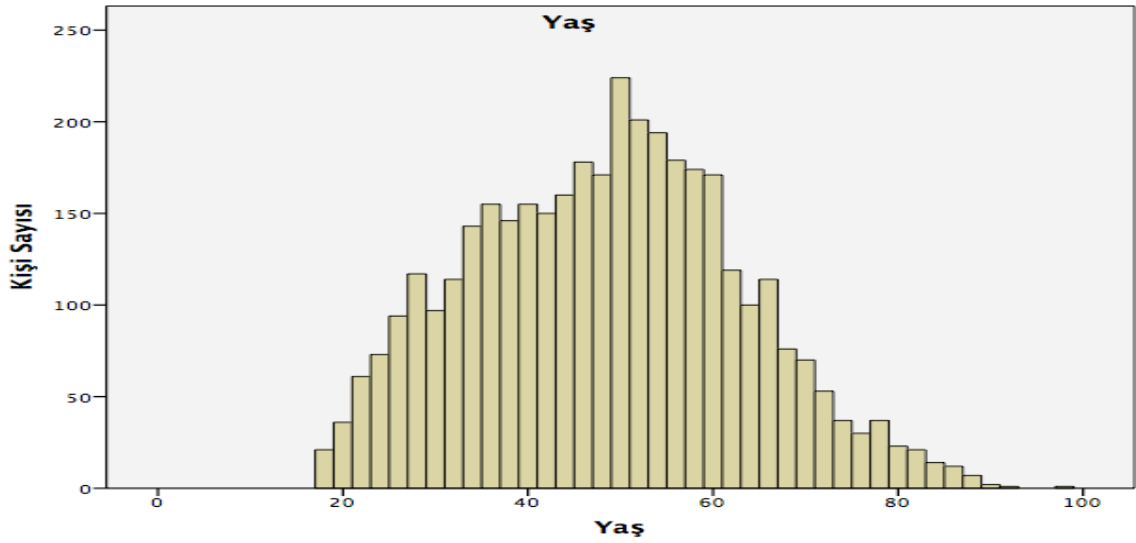
Kontrol grubu ve SARD hasta grubu arasında yüzde oranlar karşılaştırılırken Ki-Kare testi yapıldı. Hastalık grupları arasında ortalamalar karşılaştırılırken en az 1 tanesinde normal dağılım gözlenmediği için Mann-Whitney U testi ile karşılaştırma yapıldı. Veriler ortalama (ort) \pm standart sapma (SD), sayı (n) ve yüzde (%) olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Gruplar Arası Yaş ve Cinsiyet Verileri

Bütün gruplar içerisinde yaş aralığı 18-98 yaş arasındadır. Yaş ortalaması 47.95'tir. Gruplar içindeki yaş dağılımları histogram tablosuyla Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplar Arası Yaş Dağılım Grafiği



Gruplar arası yaş dağılımları hesaplanırken Kolmogorov-Smimov testi kullanılmıştır.

SARD hastalık grupları ile kontrol grubu yaş dağılımları incelendiğinde normal dağılıma uymadığı görülmüştür. Bu iki grup arası yaş dağılımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar için ortanca yaş değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Hastalık ve kontrol gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımları açısından benzerlik bulunmamaktadır.

Kontrol grubu yaş aralığı 20-65 yaştır. 507 kişiden oluşan kontrol grubu yaş ortalaması 36.64 bulunmuştur. Kontrol grubu, SARD bulunan bireylere oranla daha genç yaş grubundan oluşmaktadır ve erkek cinsiyet hakimdir.

Hastalık grubu yaş aralığı 18-98 yaşdır. 3224 kişiden oluşan hastalık grubu yaş ortalaması 49.72 bulunmuştur. Bu grupta yer alan bireylerin yaş aralıkları normal dağılıma uymamaktadır. Standart sapma 14. olarak bulunmuştur. SSc ve Sjögren sendromu hasta grupları arasındaki yaş dağılımı normal dağılıma uymaktadır. Kontrol grubu ve hasta grupları içerisinde SSc ve Sjögren sendromu tanılı grup dışındakilerde istatistiksel olarak yaş ve cinsiyet açısından normal dağılım gözlenmediği için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kontrol grubundaki bireylerin çoğunluğu erkeklerden oluşmakta fakat hastalık grubunda ise çoğunluğu kadın cinsiyet oluşturmaktadır.

Çalışmamızdaki cinsiyet dağılımları incelendiğinde çalışmaya dahil edilen gruplarda kadın cinsiyet %72.9 , erkek cinsiyet %27.1'dir (n=3731). Hasta ve kontrol gruplarının kendi içerisindeki cinsiyet dağılımları incelendiğinde SARD hastalık grubunda kadın cinsiyet, kontrol grubunda ise erkek cinsiyet hakimdir. Gruplar içerisindeki cinsiyet dağılımları sayı ve yüzde olarak Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Gruplar Arası Cinsiyet Dağılım Oranları ve Sayısı

Cinsiyet	BDH	RA	SLE	AS	SSc	Sjögren S	Kontrol	Toplam n, oran %
Kadın n Grup içi%	2137 %83.63	323 %77.27	92 %91.08	26 %60.46	34 %94.44	68 %95.77	41 %8.09	2721 %72.9
Erkek n Grup içi %	418 %16.37	95 %22.73	9 %8.92	17 %39.54	2 %5.56	3 %4.23	466 %91.91	1010 %27.1
Toplam n %	2555 %68.48	418 %11.20	101 %2.70	43 %1.15	36 %0.96	71 %1.90	507 %13.58	3731 % 100.0

4.2 Gruplar Arası IIF ANA Testi Verileri

Çalışmamızdaki 3224 kişiden oluşan SARD hastalık grubu içerisinde 418 hasta (%12.96) RA, 101 hasta (%3.13) SLE, 43 hasta (%1.33) AS, 36 hasta (%1.11) SSc, 71 hasta (%2.20) Sjögren sendromu, 2555 hasta (%79.24) BDH ön tanısı olan hastalar bulunmaktadır.

Bütün grupların IIF incelemesinde ANA pozitiflik oranları Tablo 5'te gösterilmiştir. RA tanı grubunda %10.3 (n=418), SLE tanı grubunda %48.5 (n=101), AS tanı grubunda %4.7 (n=43), SSc tanı grubunda %58.3 (n=36), Sjögren sendromu tanı grubunda %22.5 (n=71), BDH ön tanı grubunda %9.3 (n=2555) olarak saptanmıştır. Kontrol grubu IIF ANA incelemesinde pozitiflik %0.6 (n=507) oranında saptanmıştır. SARD tanı grubu içerisinde yer alan hastalıkların ANA pozitiflik saptanma oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beklendiği üzere istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

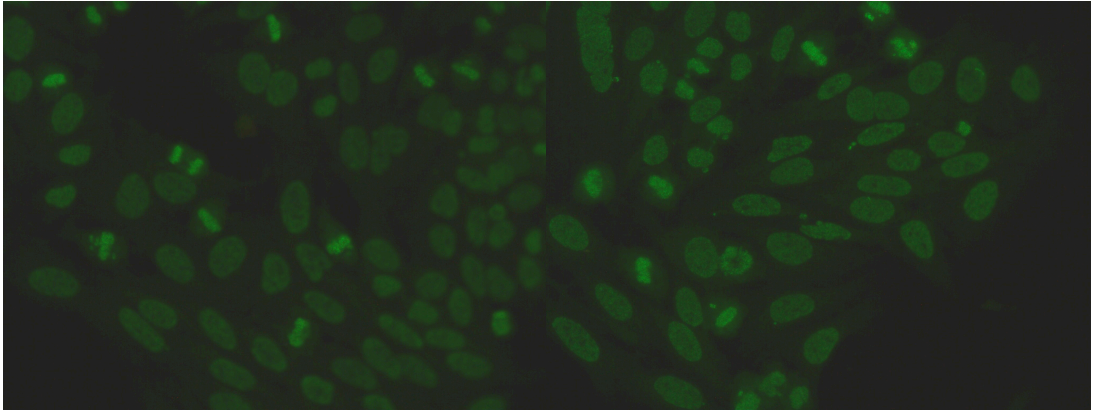
Tablo 5. Gruplar Arası IIF İncelemesinde ANA Pozitiflik Oranları

ANA IIF	Negatif	Pozitif	Toplam
BDH n Grup içi %	2318 %90.7	237 %9.3 (p<0.001)	2555 %100.0
RA n Grup içi %	375 %89.7	43 %10.3 (p<0.001)	418 %100.0
SLE n Grup içi %	52 %51.5	49 %48.5 (p<0.001)	101 %100.0
AS n Grup içi %	41 %95.3	2 %4.7 (p<0.001)	43 %100.0
SSc n Grup içi %	15 %41.7	21 %58.3 (p<0.001)	36 %100.0
Sjögren S n Grup içi %	55 %77.5	16 %22.5 (p<0.001)	71 %100.0
Kontrol n Grup içi %	503 %99.4	4 %0.6 (p<0.001, Ki-Kare)	507 %100.0

4.3 Gruplar Arası IIF ANA Testi Anti-DFS70 Patern Verileri

IIF testinde Hep-2 hücrelerinde saptadığımız boyanma paterni, interfaz çekirdekleri boyunca ve metafaz kromatini üzerinde düzgün yayılı ince benekler olarak görülür. Bu boyanma şekli, homojen ve yoğun ince benekli boyanma tipinden ayırt edilebilmelidir.

Çalışmamızda kontrol grubunda yer alan 507 örnekten 4 tanesinde anti-DFS70 paternini saptadık. Hastalık grupları içerisinde; 6 RA, 3 SLE, 1 Sjögren sendromu ve BHD ön tanısı olan grupta ise 33 anti-DFS70 paterni saptadık. Çalışmamızda saptadığımız anti-DFS70 patern IIF görüntüleri Şekil 11’de gösterilmiştir.



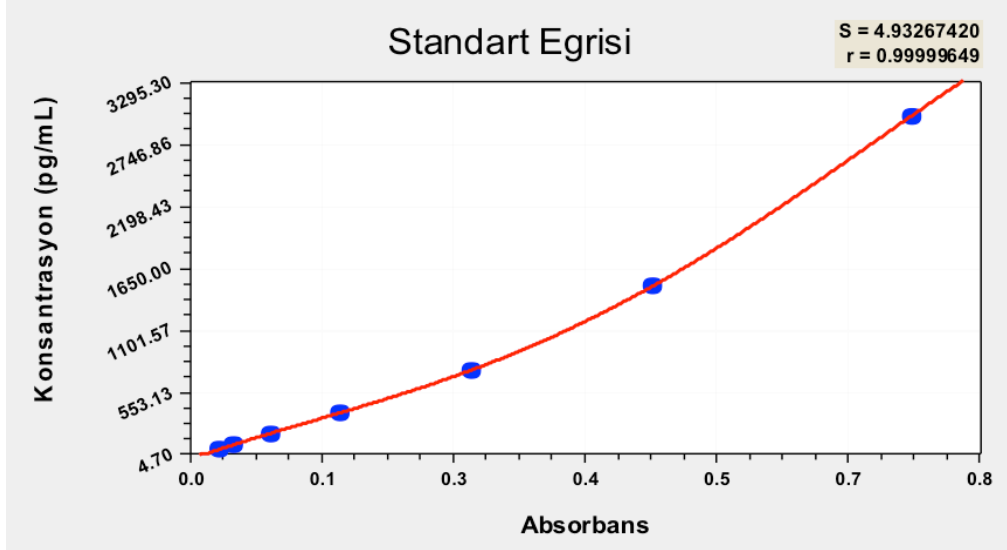
Şekil 11. ANA IIF Anti-DFS 70 Pozitif Patern Görüntüleri

4.4 Gruplar Arası Anti-DFS70 Patern Örneklerinin ELISA Testinde Doğrulanması

IIF ANA testinde anti-DFS70 antikoru pozitif saptanan hasta ve kontrol serum örneklerinin ELISA testi ile doğrulanması sağlandı. İnsan PC4 ve SFRS1 etkileşimli protein 1 (PSIP 1) ELISA testi üretici firma önerileri doğrultusunda kit

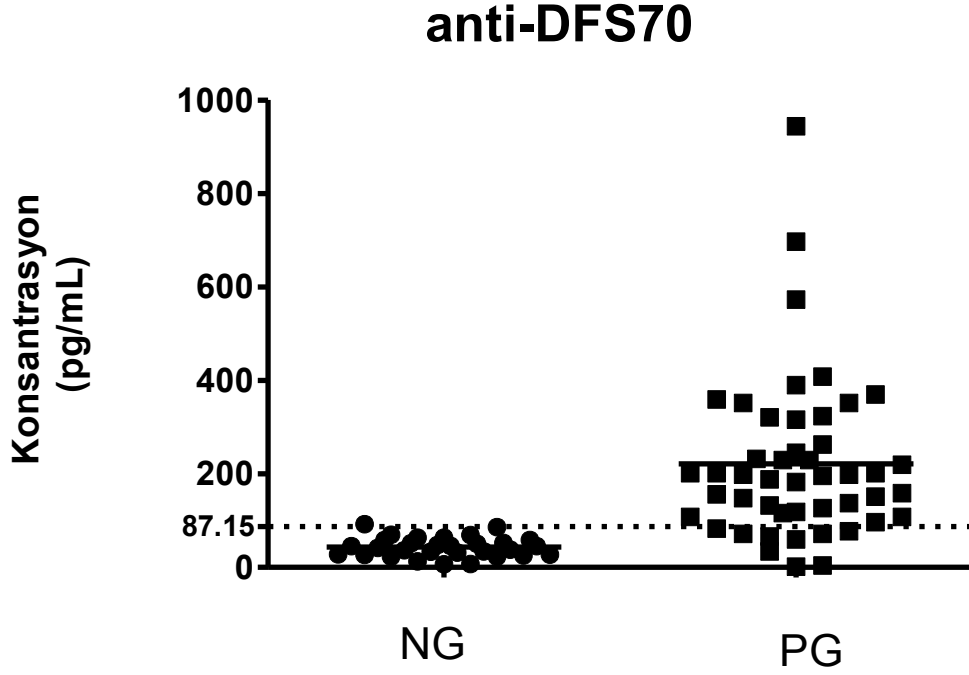
uygulama prensibine göre yapıldı. Toplam 43 hasta ve 4 kontrol grubuna ait serum örneği, 7 adet standart ve üretici firma önerisi ile 32 adet negatif kontrol serum örneği çalışıldı. Elde edilen optik dansiteler yine üretici firma önerisi ile dört parametrelili lojistik eğri-uyum hesaplama formülü ile hesaplanarak serum konsantrasyonları elde edildi. Standart eğrisi Tablo 6'da gösterildiği gibi oluşturularak istatistik yazılım programında anti-DFS70 pozitif serum örnekleri ve negative kontrol serum örnekleri için cut-off değeri hesaplandı. ELISA testimiz için hesaplanan cut-off değeri 87.15 pg/mL (ort +2SD) olarak kabul edildi.

Tablo 6. Konsantrasyon ve Absorbans Standart Eğrisi



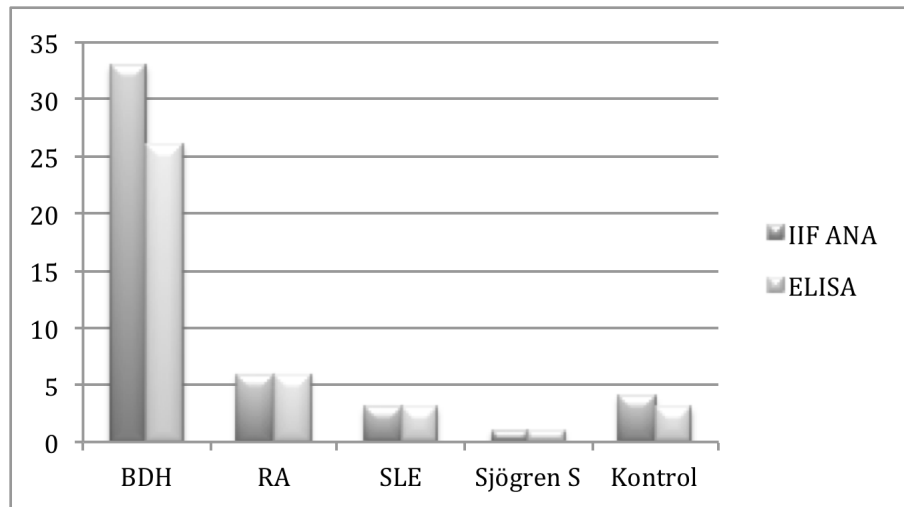
Anti-DFS70 pozitif serum örnekleri (PG) ve kontrol serum örneklerinin (NG) konsantrasyon (pg/mL) cut-off değeri Tablo 7 'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Anti-DFS70 Cut-off Konsantrasyon Grafiği



IIF ANA testinde anti-DFS70 pozitif saptanan 47 serum örneğinden 39 tanesi ELISA testinde pozitif olarak saptanmıştır. Negatif kontrol 32 serum örneğinin 1'i cut-off değerinin üzerinde bulunmuştur.

Tablo 8. IIF ANA ve ELISA testi Anti-DFS70 Antikor Sayıları



IIF ANA testinde Anti-DFS70 antikoruna saptanan kontrol grubu serum örneklerinden 1 tanesi ELISA testinde negatif olarak bulunmuştur. BDH öntanı grubunda 39 hasta serumu örneğinden 7'sinde anti-DFS70 antikoruna negative olarak saptanmıştır. Diğer hastalık gruplarından serum örnekleri ELISA testinde de pozitif olarak bulunmuştur. Tablo 8'de ELISA ve IIF ANA testinde saptanan anti-DFS70 antikor sayıları gösterilmiştir.

SARD hastalık grubu ve kontrol grubunda anti-DFS70 antikor pozitiflik oranları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Gruplar Arası Anti-DFS70 Antikor Oranı

Anti-DFS70/LEDGF	Negatif	Pozitif	Toplam
BDH n Grup içi %	2529 %99.0	26 %1.05 (p=0.460)	2555 %100.0
RA n Grup içi %	412 %98.6	6 %1.4 (p=0.313)	418 %100.0
SLE n Grup içi %	98 %97.0	3 %2.97 (p=0.061)	101 %100.0
AS n Grup içi %	43 %100.0	0 %0.0 (p=1.0)	43 %100.0
SSc n Grup içi %	36 %100.0	0 %0.0 (p=1.0)	36 %100.0
Sjögren S n Grup içi %	70 %98.6	1 %1.4 (p=0.409)	71 %100.0
Kontrol n Grup içi %	504 %99.4	3 %0.6 (p=0.280 ,Ki-Kare)	507 %100.0

SARD tanı grubu içerisinde yer alan hastalıkların anti-DFS70 pozitiflik oranları Fisher's extract test ile hesaplanmıştır. Hastalık grupları arası p değerleri $p>0.05$ olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerde hastalık grupları içerisinde

istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. RA tanı grubunda %1.4, SLE tanı grubunda %2.97 Sjögren sendromu tanı grubunda %1.4 ve BDH ön tanısı olan grupta %1.05 oranında bulunmuştur.

Kontrol grubu ile SARD tanı grubu arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.280$, $p>0.05$). Kontrol grubu anti-DFS70 pozitif oranı %0.6 olarak bulunmuştur.

IIF ANA testinde anti-DFS70 paterni kuşkulu saptanan serum örneklerine, diğer ANA subtip antikor birlikteliği açısından ENA testi uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmede RA ve Sjögren sendromu tanılı 2 hastada anti-Ro pozitif saptanmıştır. Kontrol grubu serum örneğinden 2 tanesinde anti-centromer B ve anti-Sc170 pozitif olarak saptanmıştır.

5.TARTIŞMA

İndirekt immünfloresan yöntemi rutinde ANA tespitinde en sık kullanılan ve altın standart olan testtir (8). Tipik DFS IIF boyama modeli çekirdeğin interfaz evresi boyunca ve metafaz kromatinlerinde eşit olarak dağılmış ince benek paterni olarak kabul edilmektedir (106). Araştırmamızda kontrol ve hasta gruplarında (BDH, SLE, RA, SSc, AS, Sjögren sendromu), anti-DFS70 antikorunun görülme sıklığını IIF test yöntemiyle saptamayı amaçladık.

IIF testinde 507 kişiden oluşan kontrol grubunda 4 bireyde anti-DFS70 otoantikoru pozitif saptadık. ELISA testi ile doğrulamasında 3/4 hasta pozitif olarak değerlendirildi. Kontrol grubunda anti-DFS70 otoantikoru %0.6 olarak saptandı.

Watanabe ve ark. (101)'nin sağlıklı 597 hastane çalışanında anti-DFS70 antikor sıklığını değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada IIF testinde 64 kişide anti-DFS70 pozitif saptanmıştır (%11). Tüm grup rekombinant DFS70 antijeni içeren IB testi ile tarandığında anti-DFS70 pozitif 71 hasta saptanmıştır. IIF testinde pozitif saptanan 64 kişi IB testinde de pozitif bulunmuştur. ELISA testinde ise 82 örnek pozitif saptanmıştır. IB de pozitif saptanan 64 örnekten 57'si ELISA testinde gerçek pozitif, 7'si yalancı negatif olarak bulunmuştur. ELISA testinin sensitivitesi %89 olarak saptanmıştır.

Daniels ve ark. (107) prostat kanseri olan 207 erkek birey, 166 sağlıklı erkek birey ve 82 erkek kan donörü kullanarak, bu bireylerde DFS70 (LEDGF/p75) antijeninin ekspresyon yüzdesini ve DFS70 otoantikorusunun varlığını saptamayı amaçlamışlardır. Kan donörlerinde saptadıkları anti-DFS70 pozitiflik oranı %2.3 iken, biz kan donörlerinde %0.6 anti-DFS70 pozitifliği saptadık. Erkek bireylerinde bu oran %0.64 (n=466) olarak bulundu.

Ayaki ve ark. (110) LEDGF' ye karşı oluşan antikorların prevalansına yönelik 650 kan bankası donörü üzerinde yaptıkları çalışmada ELISA testi ile %5.4 oranında pozitif bulunmuştur. Yaş grupları ve anti-LEDGF antikor reaktivitesi

arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Yamada ve ark. (109) Vogt-Koyanagi-Harada sendromu olarak adlandırılan çoklu organ tutulumu ile seyreden sistemik otoimmün hastalık grubu üzerinde yaptıkları çalışmada anti-LEDGF otoantikörlerini ELISA ile saptanmışlar, sağlıklı kontrol grubuna oranla Vogt-Koyanagi-Harada sendromunda (%66.7) farkedilir derecede yüksek bulmuşlardır.

Kan bankası sağlıklı donörlerinin, demografik verileri tam olarak bilinmemektedir. Anti-DFS70 pozitifliğinin düşük oranda saptanmasının yaşam koşullarıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Toplumun gelişmişlik düzeyi, çevresel etkenler ve stres bireyde otoantikör oluşmasına neden olabilir ve buna bağlı olarak otoimmün hastalıklarda artış olabilir (5). Kontrol grubu örneklerinde erkek cinsiyet ağırlığı vardır, buna karşılık SARD genellikle kadın popülasyonda yüksek oranda gözlenmektedir. Çalışmamızdaki SARD ve kontrol grubu arasındaki cinsiyet dağılımının eşitsizliği nedeniyle anti-DFS70 antikörlerinin cinsiyetler arasındaki dağılımı hakkında yorum yapmamızı güçleştirmektedir.

Çalışmamızdaki SARD hastalık grupları içerisinde IIF ANA testinde anti-DFS70 43 hastada pozitif saptanmıştır. ELISA testinde 36/43 hastada pozitif olarak değerlendirilmiştir. SLE hasta grubunda 3/101 (% 2.97), RA hasta grubunda 6/418 (%1.4), Sjögren sendromu hasta grubunda 1/71 (%1.4), BDH ön tanılı hasta grubunda 26/2555 (%1.05) olarak saptanmıştır. Buna karşılık SSc ve AS hasta grubunda anti-DFS70 saptanmamıştır.

Bizarro ve ark. (104) ardışık 21516 örnek üzerinde yaptıkları IIF ANA taramasında 172 hastada anti-DFS70 antikörü pozitif saptanmıştır ve prevalansı %0.8 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda SARD hasta grubu içerisinde bu oran %1.11 olarak bulundu.

Araştırmamızda SARD hastalık grubu içerisinde anti-DFS70 antikör pozitif hastaların yaş dağılımı incelendiğinde 40 yaş üstü hastalarda %66.6 bulunmuştur. Yaş ortalaması kadın cinsiyette 44.5 (25-69 yaş), erkek cinsiyette 56.6 (44-69 yaş) dır. Mahler ve ark.(8) yaptıkları çalışmada anti-DFS70 antikör pozitif saptanan

kadınlarda yaş ortalaması 47.5(14-80 yaş), erkeklerde yaş ortalaması 45.3 (25-63 yaş) olarak bulunmuştur ve anti-DFS70 antikor reaktivitesi ile bireylerin yaş ortalaması arasında fark gözlenmemiştir.

Mahler ve ark. (8) SLE hastalarından oluşan 251 örneği anti-DFS70 antikorları ile serolojik ve kinik birliktelik açısından analiz etmişlerdir. Geniş hasta grubu üzerinde yapılan bu çalışmada IIF testinde anti-DFS70 antikor sıklığı %1.62'dir (n=3263). IIF testinde 7 hastada anti-DFS70 pozitif saptanmıştır. Daha sonra CIA ile test edilen bu örneklerde 6/7 hastada anti-DFS70 pozitif saptanmıştır. CIA ile saptanan anti-DFS70 antikorlarının farklı gruplardaki prevalansı ; %8.9 (n=124) sağlıklı bireyler, %2.8 SLE (n=251), %2.6 RA (n=39), %4.0 astım (n=25), %5.0 interstisyel sistit (n=40), %1.7 Graves hastalığı (n=60), %6.0 Hashimoto tiroidit (n=67) olarak belirtilmiştir. Anti-DFS70 antikor prevalansı sağlıklı bireylerde SARD olan hastalara oranla daha yüksek saptanmıştır (p=0.00085). SLE hasta grubu sonuçlarında anti-DFS70 antikor ile klinik bulgular ve diğer otoantikorlar açısından anlamlı bir birliktelik saptanmamıştır. Anti-DFS70 pozitif saptana 7 hastadan sadece 1'inde anti-Sm antikor pozitif bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ise SLE tanılı hasta grubunda ANA subtip birlikteliği gözlenmemiştir. Fakat ENA testi yaptığımız 2 hastada anti-Ro antikor birlikteliği saptanmıştır. Bu hastalardan bir tanesi RA grubuna diğeri ise Sjörge Sendromu grubuna aittir. Nükleer boyanmaya neden olan antikor tiplerinin birbirinden ayırt edilmesi IIF yönteminde zordur. IB yönteminde ise hedef antijene karşı gelişen antikorların özgül ve duyarlı bir şekilde saptandığı bilinmektedir. Tek bir örnekle bile hızlı bir biçimde sonuç vermesi ve bir test stribinde birkaç farklı antikorun saptanabilmesi immünoblot yönteminin önemli avantajlarından. Ancak teknik hatalara ve solusyonların saklanma koşullarına bağlı olarak yalancı pozitiflik verebilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (116).

Muro ve ark. (106)'nın çalışmasında anti-DFS70 pozitif saptanan 7 SLE hastasının 4'ünde anti-SSA/Ro antikor, 6/7 hastada dsDNA ve 2/7 hastada da anti-Sm antikor pozitif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda anti-DFS70 pozitif saptanan 3 SLE hastasından yalnızca birinde dsDNA pozitif bulunmuştur.

Watanabe ve ark. (101)'nin çalışmasında 200 kişilik SARD tanılı hasta grubu üzerinde anti-DFS70 antikoru araştırılmıştır ve prevalansı %1.5 olarak saptanmıştır. Sjögren sendromlu hastalarda bu oran %6.6 bulunmuştur. Araştırmamızda Sjögren sendromunda prevalansı %1.4 (n=71) olarak saptadık. Ayrıca Watanabe'nin çalışmasında SARD grubu, 597 sağlıklı birey ile karşılaştırıldığında anti-DFS70 antikoru sağlıklı bireylerde 35 yaş altında daha sık görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrol grubunda anti-DFS70 saptanan bütün örnekler 50 yaş üzerindedir.

Kang ve ark. (115)'nin DFS paterninin sağlıklı bireylerde ve çeşitli hastalıklar üzerindeki ilişkisini araştırdıkları IIF test çalışmasında 2654 hastada anti-DFS70 oranı %13.3 bulunmuştur. DFS patern sıklığı seboreik dermatitte % 14.3, RA'da %16.9 , SLE'de %15.4, Sjögren sendromunda %14.3 oranında saptanmıştır. Önceki gözlemlerin aksine DFS paterninin otoimmün hastalıklarla ilişkili olmadığı diğer hastalıklarla ilişkisinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda, 36 bireyden oluşan SSc hasta grubunda anti-DFS70 otoantikoru rastlanmamıştır. Ochs ve ark. (108) Skleroderma hastalarından oluşan 40 birey üzerinde yaptıkları IIF ve IB çalışmalarında 1 bireyde (%2.5) anti-DFS70 antikor pozitifliği saptamıştır. Aynı şekilde sklerodermalı 50 hastadan oluşan bir grupta IIF ve IB çalışması yapan Watanabe ve ark. (101) Sklerodermalı 50 hastada anti-DFS70 otoantikoru saptamamıştır. Bu iki çalışma, araştırmamızdaki SSc hasta grubunda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur. Anti-DFS70 otoantikorunun SSc hastalık grubunda yüzdesinin düşük olduğu veya hiç olmadığı görülmüştür.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızda elde ettiğimiz verilere göre anti-DFS70 otoantikoru sağlıklı kontrol gurubunda %0.6 oranında saptanmış olup SARD içerisinde yer alan hastalık grupları içerisinde dağılımı farklılık göstermektedir. RA %1.4 , SLE %2.97, Sjögren sendromu %1.4 ve BDH ön tanıli hastalık gurubunda ise bu oran %1.05 saptanmıştır. Bu sonuçların aksine AS ve SSc hasta gurubunda anti-DFS70 antikoruna rastlanmamıştır. Kontrol grubundaki sağlıklı bireylerde antikorun düşük saptanmasının demografik özellikler ile ilgili olabileceği göz önünde bulundurularak toplumun farklı kesimlerinde yapılacak çalışmaların daha aydınlatıcı veriler sunacağı düşünülmektedir.

Yapılan tüm bu çelişkili sonuçların elde edildiği çalışmaların ışığında anti-DFS70/LEDGF otoantikorlarının doğal mı yoksa inflamatuvar hastalıkların bir göstergesi mi olduğu netleştirilmeli ve/veya çözümlenmesi konusunda ileri çalışmaların gerekliliği göz ardı edilememelidir. Diğer yandan bu otoantikorların sağlıklı bireylerde yüksek oranlarda görülmesi ve sistemik otoimmün hastalığı olan bireylerde ise çok düşük düzeylerde saptanması çalışmalarda dikkat edilmesi gereken noktalardan biridir. Ayrıca yapılan çalışmalarda sistemik seyirli romatolojik inflamatuvar hastalıkların yanında; AD, astım, intertisyel sistit, Vogt-Harada sendromu gibi rahatsızlıklarda da varlığını göstermektedir. Bu otoantikorların kronik inflamatuvar durumlarda özellikle kadınlar üzerindeki etkileri de dikkate alınarak araştırılması gerekmektedir.

Bu gözlemler büyük hasta grupları ve sağlıklı kontrol grupları üzerinde genişletilerek farklı ülke ve popülasyonlardaki etnik gruplar arasında tekrarlanmalıdır. Yapılacak çalışmaların çoklu antikor saptama metodları üzerinde gerçekleştirilmesi yanlış pozitiflikleri ve negatiflikleri ekarte etme açısından ayrıca önemlidir.

ÖZET

Sistemik otoimmün romatolojik hastalıklar önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Otoimmün romatizmal hastalıklar birçok ortak özellik ve klinik belirtiyeye sahip olmalarına rağmen, klinik seyirlerinde önemli ayrımlar bulunmaktadır. Hücre içi antijenlere karşı üretilmiş olan antinükleer antikolar gibi çeşitli otoantikoların varlığı SARD'ın özellikleridir.

Bu çalışmada rutin ANA IIF testinde sıklıkla saptanabilen ama hakkında çok fazla araştırma yapılmamış olan anti-DFS70 (anti-LEDGF) otoantikorumun, sistemik otoimmün romatolojik hastalığın tanısına katkısının araştırılması ve elde edilen sonuçlar ışığında bu otoantikorum olası öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Anti-DFS70 antikolar, ilk olarak, interstisyel sistitli, bir hastanın ANA IIF test paterninde tanımlanmıştır. Tipik DFS IIF boyama modeli çekirdeğin interfaz evresi boyunca ve metafaz kromatinlerinde eşit olarak dağılmış ince benek paterni olarak kabul edilmektedir. Fakat birincil hedef otoantijen ilk olarak lens epitelinde türevli büyüme faktörü (LEDGF) veya DNA bağlayan transkripsiyon koaktivatör p75 olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızda 507 bireyden oluşan sağlıklı kan donörü kontrol grubu olarak kullanıldı. Otoimmün hastalık grubu olarak; 418 Romatoid artrit tanılı birey, 101 SLE tanılı birey, 36 Sistemik Skleroz tanılı birey, 71 Sjögren sendromu tanılı birey, 43 Ankilozan spondilit tanılı birey, 2555 Bağ dokusu hastalığı ön tanılı birey kullanıldı. ANA IIF testinde, anti-DFS70 pozitif sonuç veren örnekler, ELISA testinde ayrıca çalışıldı. Araştırmamızda elde ettiğimiz verilere göre anti-DFS70 otoantikoru sağlıklı kontrol gurubunda %0.6 oranında saptanmış olup SARD içerisinde yer alan hastalık grupları içerisinde dağılımı farklılık göstermektedir. RA %1.4 , SLE %2.97, Sjögren sendromu %1.4 ve BDH ön tanılı hastalık gurubunda ise bu oran %1.05 saptanmıştır. Bu sonuçların aksine AS ve SSc hasta gurubunda anti-DFS70 antikoru rastlanmamıştır. ANA IIF testinde, anti-DFS70 pozitif sonuç veren örnekten 39/47 tanesi ELISA testinde pozitif saptandı.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, anti-DFS70 otoantikoru sistemik otoimmün

romatolojik hastalık tanısı içerisinde olan bazı hastalıklarda, sağlıklı bireylere göre daha sık saptanmıştır, anti-DFS70 otoantikoruunun, SARD bireyleri ve sağlıklı bireylere özgüllüğünün araştırılması için daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Anti-DFS70, LEDGF, SARD, Otoantikor

SUMMARY

Systemic autoimmune rheumatic diseases are major cause of morbidity and mortality. Although autoimmune rheumatic diseases have many common features and clinical symptoms, they have important distinctions in the clinical course. The presence of various autoantibodies, such as antinuclear antibodies produced against intracellular antigens, are characteristic of systemic autoimmune rheumatic disease.

Although anti-DFS70 antibodies are commonly determined in ANA IIF test, there have been few studies about these antibodies linked to various disease conditions. Therefore, in this study, we aimed to investigate the prevalence of anti-DFS70 antibodies in systemic autoimmune rheumatologic diseases and to evaluate the significance of these antibodies, accordingly.

Anti-DFS70 antibody was first time identified as ANA IIF pattern in a patient with interstitial cystitis. The typical DFS has been described as IIF staining pattern which is uniformly distributed throughout the interphase nucleus and, most notably, are localized on metaphase chromosomes. It was named as DFS70 after 70-kDa protein was detected in the immunoblot test. However, primary target auto-antigen was first identified as lens epithelial-derived growth factor (LEDGF) or DNA binding transcription coactivator p75.

In our study we created test groups as; 507 healthy blood bank donors, 418 Rheumatoid arthritis, 101 SLE patients, 36 Systemic sclerosis patients, 71 Sjögren syndrome patients, 43 Ankylosing spondylitis and 2555 Connective tissue disease (CTD) pre-diagnosed patients. Anti-DFS70 positive samples in ANA IIF were also tested in ELISA test. In this study, anti DFS70 autoantibody level was detected %0.6 in healthy controls. The distribution of anti DFS70 antibody level was varied between different disease groups in SARD. It was detected %1.4 in RA, %2.97 in SLE, %1.4 in Sjögren syndrom and %1.05 in disease group with pre-diagnosed CTD. In spite of these results, anti-DFS70 antibody was not detected in AS and SSc patient groups. Totally 39 out of 47 samples were also found to be anti DFS70 positive on ELISA test.

According to our results, anti-DFS70 autoantibody is detected more

commonly in certain disease sub-groups of SARD than healthy individuals. More comprehensive studies are needed to be done to investigate the anti-DFS70 autoantibody specificity for SARD patients and healthy individuals.

Key Words: Anti-DFS70, LEDGF, SARD, Autoantibody

KAYNAKLAR

1. Ganapathy V, Casiano C a. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):684-8. doi:10.1002/art.20095.
2. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010;1183:267-287. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05127.x.
3. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69:1420-1422. doi:10.1136/ard.2009.127100.
4. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J. Urol.* 1994;151:587-592.
5. Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J. Biol. Chem.* 2003;278(35):33528-39. doi:10.1074/jbc.M303594200.
6. Dellavance A, Viana VST, Leon EP, Bonfa ESDO, Andrade LEC, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J. Rheumatol.* 2005;32(11):2144-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265692>. Accessed October 31, 2014.
7. Muro Y, Ogawa Y, Sugiura K, Tomita Y. HLA-associated production of anti-DFS70/LEDGF autoantibodies and systemic autoimmune disease. *J. Autoimmun.* 2006;26(4):252-7. doi:10.1016/j.jaut.2006.03.005.
8. Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 2012;39(11):2104-10. doi:10.3899/jrheum.120598.
9. Kılıçturgay K. *İmmünolojiye Giriş*. 2nd ed. Bursa: Güneş Kitabevi; 1991:1-150.
10. Abbas AK, Lichtman AH. *Textbook of Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Elsevier Health Sciences; 2003.
11. Chaplin DD. 1. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(2):S442-S459. doi:10.1067/mai.2003.125.
12. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2000;343:37-49. doi:10.1056/NEJM200010123431520.

13. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System: Second of Two Part. *N. Engl. J. Med.* 2000;343:108-117.
14. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-1789. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
15. Kılıçkaya T. Self Tolerans ve Otoimmünite. In: Kılıçturgay K, ed. *İmmünoloji*. Nobel ve Güneş Kitabevi; 2003:359-379.
16. Terzioğlu E. Self Tolerans ve Otoimmünite. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E, eds. *Klinik Romatoloji*. İstanbul: Deniz Matbaası; 1999:55-57.
17. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and Autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(9):655-664. doi:10.1056/NEJM200103013440907.
18. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:19-51. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.19.
19. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. (Y C, G D, eds.). Elsevier Health Sciences; 2014:320. Available at: <http://books.google.com/books?id=uIcrOt63QtIC&pgis=1>. Accessed October 30, 2014.
20. Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC. A range of CD4 T cell tolerance: Partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 1997;7:255-271. doi:10.1016/S1074-7613(00)80528-2.
21. Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* 2000;6:56-61. doi:10.1038/71540.
22. Naik S. The immunological basis for autoimmunity. *Immunol. Clin. J Indian Rheumatol Assoc* 2004;12:22-28.
23. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66. doi:10.1126/science.272.5258.60.
24. Ferber I, Schonrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ, Arnold B. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science (80-)*. 1994;263:674-676. doi:8303275.
25. Kurts C, Carbone FR, Barnden M, et al. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* 1997;186:2057-2062. doi:10.1084/jem.186.12.2057.

26. Kouskoff V, Lacaud G, Nemazee D. T cell-independent rescue of B lymphocytes from peripheral immune tolerance. *Science* 2000;287:2501-2503. doi:10.1126/science.287.5462.2501.
27. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000;290:89-92. doi:10.1126/science.290.5489.89.
28. Ruacan Ş. Otoimmünite. In: Ustaçelebi Ş, Günel M, eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999:245-249.
29. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002;47(4):434-44. doi:10.1002/art.10561.
30. Gülmezoğlu E, Ergüven S, eds. *İmmünoloji*. Hacettepe-Taş Kitapçılık; 1994:223-224.
31. Yeğin O. *Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları*. Akdeniz Üniversitesi; 1992:255-264. Available at: <http://books.google.com/books?id=DwaePwAACAAJ&pgis=1>. Accessed October 30, 2014.
32. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 1998;27 Suppl 1:S18-24.
33. Mitchell RS, Kumar V, Abbas AK FN. Rheumatoid Arthritis and Scleroderma. In: *Robbins Basic Pathology 8th Edition.*; 2010:3121-3125.
34. Dedhia H V., DiBartolomeo A. Rheumatoid arthritis. *Crit. Care Clin.* 2002;18:841-854. doi:10.1016/S0749-0704(02)00019-2.
35. Vogt T. Rheumatoid arthritis--clinical picture and important differential diagnoses. *Ther. Umsch.* 2005;62:265-268.
36. Derk CT. Rheumatoid arthritis: an update. *Del. Med. J.* 2005;77:59-63.
37. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2005;4:130-136. doi:10.1016/j.autrev.2004.09.002.
38. Hamuryudan V. Romatoid artrit. In: İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S, eds. *İç Hastalıkları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2012:2497-2505.
39. J.R O. Romatoid Artrit. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. Saunders Elsevier; 2011:2003-2014.
40. Dilşen N. Romatoid Artrit. In: Büyüköztürk K, T A, Dilmener M, Erzengin F, Kaysı A, Ökten A, eds. *İç Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevi; 2007:2709-2724.

41. Akar S, Birlik M, Gurler O, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Izmir-Turkey. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004;22:416-420.
42. Schneider M, Blumenroth M, Fischer-Betz B. The New ACR/EULAR Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis: Will They Change Our Trials and Clinical Management? *Int. J. Adv. Rheumatol.* 2011;9(2):56-61.
43. Lipsky PE. Romatoid Artrit. In: Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, eds. *Harrison İç Hastalıkları Prensipleri*. Nobel Tıp Kitabevleri; 2004:1928-1937.
44. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1831-1835. doi:10.1002/1529-0131(200008)43:8<1831::AID-ANR19>3.0.CO;2-6.
45. Van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999;17:689-697.
46. Visser H, Le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JMW. How to diagnose rheumatoid arthritis early: A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:357-365. doi:10.1002/art.10117.
47. Bilge I. Sistemik Lupus Eritamatozus. In: Neyzi O, Ertuğrul T, eds. *Pediyatri*. 4th ed. Nobel Tıp Kitabevi; 2010:1257-1261.
48. Makay B, Ünsal E. Jüvenil Sistemik Lupus Eritamatozus. *Klin. Gelişim Derg.* 2006;19(1):23-33.
49. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481-490. doi:10.1136/jcp.56.7.481.
50. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, et al. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995;345(8965):1595-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783536>. Accessed October 31, 2014.
51. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1997. doi:10.1002/1529-0131(200103)44:3<735::AID-ANR125>3.0.CO;2-F.
52. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-1277. doi:10.1002/art.1780251101.
53. Koehler L, Kuipers JG, Zeidler H. Managing seronegative spondarthritis. *2000:360-368.*

54. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DCO, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and H-A27. *Lancet* 1973;301:904-907. doi:10.1016/S0140-6736(73)91360-3.
55. Van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* 1984;27(3):241-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6608352>. Accessed October 31, 2014.
56. Kınıklı G. Spondiloartropatiler. In: İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S, eds. *İç Hastalıkları*. Ankara; 2012:2588-2593.
57. Van der Linden S, van der Heijde D. Ankylosing spondylitis. Clinical features. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:663-76, vii.
58. Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.* 1998;41(1):58-67. doi:10.1002/1529-0131(199801)41:1<58::AID-ART8>3.0.CO;2-G.
59. Wigley FM. Scleroderma(Systemic Sclerosis). In: Goldman L, Ausiello D, Ünal S, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. Saunders Elsevier; 2011:2032-2041.
60. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988;18:457-481.
61. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The Immunobiology of Systemic Sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2008;38:132-160. doi:10.1016/j.semarthrit.2007.10.010.
62. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* 2004;140:37-+. Available at: <Go to ISI>://WOS:000187855600006.
63. Silver R, Medsger T, Bolster M. Systemic sclerosis and scleroderma variants: clinical aspects. In: Koopman WJ, Moreland LW, eds. *Arthritis and Allied Conditions*. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005:1633-1680.
64. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;49(3):399-412. doi:10.1002/art.11113.
65. Bunn CC, Hospital RF. Systemic sclerosis : an autoantibody mosaic. 1999:207-208.

66. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1363-73. doi:10.1002/art.10977.
67. Koniçe M. Skleroderma. In: Büyüköztürk K, T A, Dilmener M, Erzenin F, Kaysı A, Ökten A, eds. *İç Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevi; 2007:2849-2856.
68. Theofilopolus A. Autoimmunity. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JW, eds. *Basis & Clinical Immunology*. 6th ed. Appleton & Lange; 1987:128-158.
69. Fernandez-Madrid F, Mattioli M. Antinuclear antibodies (ANA): immunologic and clinical significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 1976;6:83-124.
70. Firou GJ. Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957;36:890-895.
71. Monier JC. Antinuclear antibodies : Detection and diagnostic value. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* 1990;17(7):713-718. doi:10.1016/0883-2897(90)90094-H.
72. Dagenais A, Bibor-Hardy V, Senécal JL. *A Novel Autoantibody Causing a Peripheral Fluorescent Antinuclear Antibody Pattern Is Specific for Nuclear Pore Complexes*. *Arthritis and rheumatism* 31, 1322-1327 (1988).
73. Chan EKL, Pollard KM. Detection of autoantibodies to ribonucleoprotein particles by immunoblotting. In: Rose NR, de Macario EC, JD F, Lane HC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1997:928-934.
74. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 1989;44:93-151.
75. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 1982;33:167-240. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6182766>. Accessed November 1, 2014.
76. Mongey AB, Hess E V. Antinuclear antibodies and disease specificity. *Adv. Intern. Med.* 1991;36:151-69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2024580>. Accessed November 1, 2014.
77. Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ, Ward DJ, Hughes GR. Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease. I. Systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, primary sicca syndrome, and rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1985;28:285-293. doi:10.1002/art.1780280308.

78. Clotet B, Guardia J, Pigrau C, et al. Incidence and Clinical Significance of Anti-ENA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus: Estimation by Counterimmunoelectrophoresis. 2009. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/03009748409102662?journalCode=rhe#.VFVCbFKMr08.mendeley>. Accessed November 1, 2014.
79. Tápanes FJ, Vásquez M, Ramírez R, Matheus C, Rodríguez MA, Bianco N. Cluster analysis of antinuclear autoantibodies in the prognosis of SLE nephropathy: are anti-extractable nuclear antibodies protective? *Lupus* 2000;9:437-444. doi:10.1191/096120300678828604.
80. Us DE. Antinükleer Antikorlar ve Hastalıklarla İlişkileri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 1992;26(4):379-389.
81. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J. Clin. Invest.* 1986;77:426-430. doi:10.1172/JCI112320.
82. Keser G. Romatolojik Hastalıkların Tanısında Hematolojik, Biyokimyasal ve Serolojik İncelemeler. In: Gümüüşdiş G, Doğanavşargil E, eds. *Klinik Romatoloji*. İstanbul: Deniz Matbaası; 1999:147-159.
83. Wiik A. The value of specific ANA determination in rheumatology. *Allergy* 1987;42(4):241-261. doi:10.1111/j.1398-9995.1987.tb02207.x.
84. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 1995;24(5):323-358. doi:10.1016/S0049-0172(95)80004-2.
85. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000;124:71-81. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<0071:GFCUOT>2.0.CO;2.
86. Nakamura RM, Tan EM. Recent advances in laboratory tests and the significance of autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin. Lab. Med.* 1986;6(1):41-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2420510>. Accessed November 3, 2014.
87. Reichlin M, Wasicek CA. Clinical and biologic significance of antibodies to Ro/SSA. *Hum. Pathol.* 1983;14(5):401-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6840751>. Accessed November 3, 2014.
88. Emerk K. Romatizmal hastalıklarda laboratuvar bulguları. In: Tuna N, ed. *Romatizmal Hastalıklar*. İstanbul: Taş Yayıncılık; 194AD:51-87.
89. Bradwell A. *Atlas of HEp-2 Patterns and Laboratory Techniques*. Birmingham: Binding Site; 2003.

90. Craft J, Hardin JA. Immunoprecipitation assays for the detection of soluble nuclear and cytoplasmic nucleoproteins. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1992:747-754.
91. Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, Watanabe H. Detection of anti-nuclear antibodies from patients with systemic rheumatic diseases by ELISA using HEp-2 cell nuclei. *J. Clin. Lab. Anal.* 1991;5(1):49-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1999763>. Accessed November 3, 2014.
92. Damoiseaux JGMC, Tervaert JWC. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun. Rev.* 2006;5(1):10-7. doi:10.1016/j.autrev.2005.05.007.
93. Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmun. Rev.* 2007;7(1):77-84. doi:10.1016/j.autrev.2007.08.003.
94. Birlik AM. Antinükleer Antikorların Klinikteki Kullanımı. *Türkiye Klin. J. Rheumatol. Spec. Top.* 2013;6(2):6-23. Available at: <http://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-antinukleer-antikorlarin-klinikteki-kullanimi-66193.html>. Accessed November 8, 2014.
95. Ganapathy V, Daniels T, Casiano CA. LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis. *Autoimmun. Rev.* 2003;2(5):290-297. doi:10.1016/S1568-9972(03)00063-6.
96. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005;38(1):3-9. doi:10.1080/08916930400024612.
97. Ballou SP, Kushner I. Anti-native DNA detection by the Crithidia luciliae method: an improved guide to the diagnosis and clinical management of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1979;22(4):321-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/371628>. Accessed November 3, 2014.
98. Chubick A, Sontheimer RD, Gilliam JN, Ziff M. An appraisal of tests for native DNA antibodies in connective tissue diseases. Clinical usefulness of Crithidia luciliae assay. *Ann. Intern. Med.* 1978;89(2):186-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/354450>. Accessed November 3, 2014.
99. Hep-2-image-library. *Univ. Birmingham* 2014. Available at: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/hep-2-image-library/index.aspx>.
100. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch.*

Pathol. Lab. Med. 2000;124(1):71-81. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<0071:GFCUOT>2.0.CO;2.

101. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):892-900. doi:10.1002/art.20096.
102. Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J. Autoimmun.* 2004;23(3):257-66. doi:10.1016/j.jaut.2004.07.004.
103. Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, et al. LEDGF/DFS70, a major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of keratohyalin granules. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(1):75-80. doi:10.1038/sj.jid.5700487.
104. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al. Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1107:174-83. doi:10.1196/annals.1381.019.
105. Sarkar K, Miller FW. Autoantibodies as predictive and diagnostic markers of idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2004;37(4):291-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15518044>. Accessed November 3, 2014.
106. Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus* 2008;17(3):171-6. doi:10.1177/0961203307086311.
107. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 2005;62(1):14-26. doi:10.1002/pros.20112.
108. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EKL, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105(6):1211-1220. doi:10.1067/mai.2000.107039.
109. Yamada K, Senju S, Shinohara T, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol. Lett.* 2001;78:161-168. doi:10.1016/S0165-2478(01)00243-7.
110. Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 2002;35:319-327. doi:10.1080/0891693021000003198.

111. Fritzler M, Fritzler M. The Emergence of Multiplexed Technologies as Diagnostic Platforms in Systemic Autoimmune Diseases. *Curr. Med. Chem.* 2006;13(21):2503-2512. doi:10.2174/092986706778201639.
112. Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2012;11(9):642-5. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.005.
113. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):191-200. doi:10.1002/art.30084.
114. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:494356. doi:10.1155/2012/494356.
115. Kang SY, Lee W-I. [Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using indirect immunofluorescence method]. *Korean J. Lab. Med.* 2009;29(2):145-51. doi:10.3343/kjlm.2009.29.2.145.
116. Berkem R, Gümüş T, Karakoç E, Acar N. Antinükleer Antikorların Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2003;37:171-178.

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

[LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZI!...]

Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrasında özgür iradenizle vermeniz gerekmektedir.

1.ARAŞTIRMAYLA İLGİLİ BİLGİLER:

1-Araştırmanın Adı: ‘Sistemik otoimmün romatolojik hastalığı olan bireylerde anti-DFS70/(LEDGF) otoantikorunun sandwich ELISA yöntemi ile araştırılması’

2-Araştırmanın İçeriği: Romatolojik hastalıklı kişilerde kanda bulunabilen Anti-yoğun ince benekli (anti-DFS70)dediğimiz antikorun ELISA denen yöntemle araştırılması.

3-Araştırmanın Amacı: Bağışıklık sisteminin romatizmal hastalıkları ciddi etkileri olan ölümcül seyirli rahatsızlıklardır. Bu hastalıklara karşı vücut çeşitli bağışıklık hücreleri üretmektedir. Bu bağışıklık hücrelerini araştırmak için geliştirilen testler bulunmaktadır. Anti-DFS70 antikorlar bu hastalıkların tanısında kullanılması araştırma aşamasında olan bir testtir. Şimdiye kadar anti-DFS70 antikoru farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen verilerde bu antikorun bağışıklık sistemi hastalıklarının tanısına ne kadar faydalı olduğu araştırılacaktır. Faydalı olduğu bulunduğu taktirde bu hastalıkların erken tanısında katkısı olacaktır. Böylece erken tanı ve tedavi ile hastalıklar önlenmiş olacaktır.

4-Araştırmanın Öngörülen Süresi: 1 yıl

5- Araştırmaya Katılması Beklenen Gönüllü Sayısı:

1. Grup:96 kişi IFAT ile Anti-DFS70 pozitif saptanan grup
2. Grup:550 kişi ise herhangi bir sistemik otoimmün romatolojik hastalığı olmayan kan bankasına başvuran sağlam gönüllüler

6- Araştırmada İzlenecek Uygulamalar ve Tedavi:

Sizin damarınızdan 5 ml kan alınacaktır. Siz kanı sorumlu hekime teslim ettikten sonra çalışmadan hiçbir şekilde sorumlu değilsiniz. Sizin kanınızda ELISA cihazı dediğimiz cihaz vasıtasıyla ve mikroskop altında inceleme yöntemi (IFAT) ile antikorlar saptanacaktır. Kanınız *anti-DFS70* denen otoantikor açısından değerlendirilecektir. Eğer kanınızda bu otoantikor

saptanırsa herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır. Elde edilen veriler istatistiksel bilimsel çalışma için kullanılacaktır.

2.ARAŞTIRMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR(LAR):

Bu araştırmada sizin için beklenen yarar(lar) : Saptanan bu otoantikoron sistemik romatizmal bir hastalığın erken tanısına katkısı araştırılacaktır.

3.GÖNÜLLÜNÜN UYGULAMA SIRASINDA KARŞILAŞABİLECEĞİ RİSKLER VE RAHATSIZLIKLAR:

Sizin kolunuzdan 5 (beş) ml kan alınacaktır. Kan alınan yerde hafif bir kanama, sonra morarma olabilir. Morarma olduğunda çalışmayı yürüten sorumlu hekime başvurabilirsiniz .

4.GÖNÜLLÜLER İÇİN ARAŞTIRMADAN BEKLENEN TIBBİ YARAR:

Çalışma sırasında herhangi bir ilaç tedavisi almayacaksınız fakat bu antikorun saptanması halinde elde edilen veriler bilimsel araştırma için kullanılacaktır. Elde edilen veriler romatizmal hastalığın erken tanısına faydası araştırılacaktır.

5.GEBELİK

Gebe ya da çocuk emziren kadınlar bu çalışmaya katılamazlar. En iyisi gebe olmadığınızdan ve çalışma boyunca gebe kalmamaya niyetli olduğunuzdan emin olmalısınız. Çalışma sırasında gebe kaldığınızdan şüphelenirseniz, hemen çalışma doktoruna haber vermelisiniz. Gebe iseniz izniniz alınmadan araştırmadan çıkarılacaksınız.

6.ARAŞTIRMAYA SEÇENEK OLAN GİRİŞİMLER YA DA TEDAVİLER KONUSUNDA BİLGİLENDİRİLME

Yukarıdaki araştırmada uygulanacak tetkik ve tedaviye yönelik girişimler dışında hastalığınızla ilgili başka uygun yöntemlerin var olduğunu, ancak bu araştırmada uygulanmayacağını öğrendim. Eğer yukarıdaki çalışmaya katılmayı kabul etmezsem sözü edilen öteki tedavileri alma hakkına sahip olduğumun bilincindeyim.

7.ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILMA DURUMLARI

Çalışma programını aksatmanız, gebe kalmanız durumunda doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

8.ARAŞTIRMA KAPSAMINDAKİ GİDERLERİN KARŞILANMASI

Yapılacak her tür tetkik ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

9.ARAŞTIRMAYA KATILMA DURUMUNDA HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

10.ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN İRTİBAT

Uygulama süresi boyunca araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için ya da araştırma dışı bir ilaç almak durumunda kaldığınızda aşağıdaki doktor ile irtibat kurabilirsiniz.

Arş.Gör.Dr Bilal Olcay PEKER

1.Telefon: 0 533 735 76 45

11.ZARARLARIN KARŞILANMASI:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımım sorumlu araştırmacı / doktor tarafından yerine getirileceğini, masraflarımın sorumlu araştırmacıların karşılayacağı bana bildirildi.

12.GÖNÜLLÜLÜK, ARAŞTIRMAYI REDDETME VE ARAŞTIRMADAN ÇEKİLME HAKKI, ARAŞTIRMADAN ÇIKARILMA:

- a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- c. Sorumlu araştırmacı / doktora haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.
- d. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / doktor ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da almakta olduğum tıbbi bakımın kalitesini yükseltmek amacıyla, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

13.GİZLİLİK:

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

14. ALINAN KAN ÖRNEKLERİNİN DURUMU

Alınan kan örnekleri başka bir çalışma için kullanılacaktır.

15.ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren **Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu** kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma yeterli cevaplar aldım.

Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verildi.

Gönüllünün :Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacı- Doktorun

Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

EK-2

OLGU RAPOR FORMU

Olgu No:

Adı Soyadı:

Yaş:

Cinsiyet:

Meslek:

Ek bilgiler:

1. Bilinen ek hastalık:
2. Sürekli kullanılan ilaç: